RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

LO SPIRITO SCIENTIFICO E L'OPERA PARASSITOLOGICA DI BATTISTA GRASSI

Ai fini di una miglior conoscenza dell'opera parassitologica svolta da BATTISTA GRASSI *e del Suo spirito scientifico, riproduciamo stralciandole dagli* « Atti del Simposio sull'opera scientifica e sociale del Prof. Battista Grassi, Como e Varenna 25-26 settembre 1954 » *le comunicazioni lette al Simposio stesso dai Proff.* BIOCCA, CORRADETTI, COTRONEI *e* LA FACE.

Ringraziamo il Comitato promotore per le onoranze a B. Grassi, *organizzatore del Simposio, per aver gentilmente autorizzato tale riproduzione.*

La Redazione

LO SPIRITO SCIENTIFICO DI BATTISTA GRASSI

GIULIO COTRONEI (*)

Pur titubante sulle mie possibilità di rendere il pensiero scientifico di BATTISTA GRASSI, sono fiducioso che anche una rievocazione inadeguata possa essere utile a lumeggiare non solo il recente passato biologico, ma ancora servire attraverso il suo pensiero, a mostrarci la via sicura del progresso biologico che il grande Maestro lombardo seguì senza deviazioni e senza soste.

Il pensiero scientifico di GRASSI è, come quello di tutti i grandi scienziati, espressione della sua potente personalità ed è dominato da una originalità incomparabile; non si possono tuttavia trascurare tutti quegli elementi che ne permisero lo sviluppo e le manifestazioni geniali; così, in primo piano l'educazione giovanile, gli ambienti e le occasioni che ne stimolarono il lavoro, i rapporti umani e sociali, le idee e ideologie filosofiche e scientifiche, o meglio le idee generali dominanti o circolanti nel tempo, e fu un periodo di mezzo secolo, della sua attività scientifica.

GRASSI non fu un filosofo della conoscenza e della ricerca sperimentale, almeno nel senso che oggi vuol darsi alla parola « filosofo »: ma nella sua opera non è difficile scorgere l'opinione che egli si era andato facendo della

(*) *Istituto di Anatomia Comparata* « G. B. GRASSI » *dell'Università di Roma.*

metafisica e di quella filosofia della natura che riconosceva suoi fondatori: FICHTE, SCHELLING ed HEGEL. Questi filosofi della natura dominarono in Germania nella prima metà del secolo decimonono ed anche un po' oltre: la loro influenza si era estesa in tutta Europa e specialmente in Italia. A Napoli era rappresentata, poco dopo il 1860, dalle scuole filosofiche di AUGUSTO VERA e di BERTRANDO SPAVENTA: questa corrente aveva anzi finito per avere, presso di noi, un netto predominio, sia pure per breve tempo e sopratutto si era infiltrata nei programmi di filosofia che si svolgevano nei licei: era quella dunque in voga tuttora, quando il giovane GRASSI, ultimato con onore il liceo, iniziava la sua formazione scientifica a Pavia.

Ascoltiamo la sua parola (1): « Per mezzo di questa così detta filosofia naturale era presso i tedeschi generale la tendenza a servirsi di una idea a priori la più elevata, la più astratta possibile, come punto di partenza da cui dedurre i fatti per mezzo del puro ragionamento. Si credeva in altre parole di poter raggiungere, per mezzo di astrazioni, le poche leggi generali, alle cui dipendenze fossero tutti gli ordini di fenomeni conosciuti ».

Questa scultorea sintesi del pensiero filosofico allora dominante è del GRASSI, il quale ci ricorda ancora che i filosofi della natura avevano esteso i loro procedimenti, che oggi potremmo chiamare astrattisti, alla biologia specialmente. OKEN si era proposto questo compito applicando l'equazione +A—A=O alla biologia, onde concludere che l'assoluto attivo e l'assoluto passivo si fondono nello zero e arrivare al principio meccanico dell'azione e della reazione e alla duplicità della forza (positiva e negativa). GRASSI così giudica con equità e serenità: « A primo aspetto queste generalizzazioni sembrerebbero tentativi interamente sterili, ma non sono sempre tali poichè anche le idee più aprioristiche hanno un fondamento più o meno remoto nei fatti, e contengono perciò una parte di realtà... Così si spiega come anche tra i più straordinari paradossi possa talvolta zampillare la verità, ed ancora come la filosofia della natura abbia potuto tenere occupati per mezzo secolo i migliori intelletti della Germania ».

Nelle teorie imperniate o derivate essenzialmente dalla concezione hegeliana degli opposti non tutto, dunque, secondo GRASSI nelle applicazioni alla biologia e alla patologia, è da buttar via, ma, ecco la sua dichiarazione di fede, che ci esprime anche l'intimo della sua natura di sperimentatore: « sarebbe stato logico che queste teorie avessero suggerito ai loro seguaci la ricerca dimostrativa nello studio diretto dei fatti, nei quali soltanto esse potevano misurare il proprio valore ». E GRASSI ha così modo di elevare un inno al metodo sperimentale » il quale aveva dato da GALILEI in poi, grandi risultati nelle scienze fisiche, applicato — ciò che sarebbe parsa in altri tempi punibile audacia — alla fisiologia ed alla patologia, fu fecondissimo di conquiste gran-

(1) Queste citazioni sono riportate da: B. GRASSI — *I progressi della biologia e delle sue applicazioni pratiche* — Tipografia della R. Accademia dei Lincei - Roma, 1911.

diose, inaspettate, immensamente benefiche, ed in così grande numero ed in così breve spazio di tempo, da indurre negli uomini la speranza e persino la illusione, che la via trovata fosse per condurre alla soluzione integrale dei problemi della vita. E se questa illusione non tardò a dileguare, le scoperte fatte rimasero solide, eterne pur celando in sè il mistero ultimo delle cose».

Può essere rilevato che quando Grassi scriveva, nel 1911, questi suoi apprezzamenti sulla filosofia naturale, sulla metodologia scientifica più opportuna ai progressi della biologia, era, ormai, giunto all'apice della sua gloria scientifica, ma occorre insistere, invece, sul fatto che tutto lo sviluppo del suo pensiero scientifico si era realizzato dimostrando, con le scoperte raggiunte, la bontà di quei procedimenti; le frasi che abbiamo riportato rappresentano il collaudo non di idee a priori, ma dell'imponente edificio scientifico, costruito secondo le severe norme del metodo sperimentale.

Non si può disconoscere, pur senza sopravalutarla, a dispetto delle eccezionali qualità naturali, la sana influenza dell'ambiente pavese, perchè faremmo una grave offesa alla sua memoria. E' doveroso ricordare che in tutta la sua vita Grassi sempre ricordò con toccante sentimento di gratitudine i legami giovanili con la scuola biologica di Pavia: quella scuola per la quale amava ripetere l'espressione: « il sole della biologia italiana ». E' a Pavia che Grassi apprende il valore dell'indirizzo sperimentale congiunto alla istruttiva valutazione istologica. A Pavia Oehl, Bizzozero, Golgi, rappresentano non soltanto gloriose figure di scienziati che seppero armonizzare nel metodo sperimentale istologia e biologia, ma anche grandi animatori e veri maestri, che fondarono scuole rimaste celebri: specialmente quella di Bizzozero, prima a Pavia e poi a Torino, e quella di Golgi a Pavia. Golgi e Maggi (ed anche Balsamo Crivelli) furono quelli che Grassi considerò suoi Maestri.

Da Golgi gli derivò quella costante preoccupazione di ricorrere, ove fosse possibile, al continuo controllo microscopico e istologico: metodo che tanta parte ebbe nelle sue conquiste scientifiche.

Da Maggi, ricercatore di ben più modesta portata, apprese tuttavia il valore della nuova zoologia biologica, che il maestro di Maggi, l'insigne quanto ingiustamente dimenticato Paolo Panceri, già assistente a Pavia di Balsamo Crivelli, aveva illustrata e divulgata dall'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Napoli.

Convinto fin dall'inizio della sua carriera dell'importanza dell'istologia Grassi ne seguì e accettò tutti gli sviluppi e basta consultare la sua fondamentale monografia sulla malaria per riconoscerla come un modello di citologia protistologica: possiamo così spiegarci questo suo caldo riconoscimento pieno di ammirazione: «Orbene, bisogna confessarlo la dottrina cellulare e la patologia cellulare costituiscono il più grande merito della scienza biologica tedesca; certo esse rappresentano, nel progresso scientifico universale, il più importante ed originale contributo portato dalla Germania alla biologia».

Ma dall'ambiente pavese, GRASSI trasse l'incitamento all'indagine parassitologica: in questo indirizzo subito affermò la sua inconfondibile personalità. Ancora una volta si dimostrò come l'ambiente possa agire favorevolmente sullo sviluppo di un germoglio scientifico; ma bisogna sopratutto che ci siano le qualità intrinseche perchè venga fuori il genio.

L'ambiente pavese, e lombardo, ricordava con le sue glorie recenti: DUBINI, BASSI, VITTADINI, MANTEGAZZA, fondamentali scoperte nel campo parassitologico; e questi ricordi aprivano l'animo del giovane alle dolci speranze di fare nella vita cose utili e degne, e stimolavano le naturali tendenze verso la biologia medica.

Interno nell'Istituto di Anatomia Comparata di Pavia, GRASSI con la collaborazione dei fratelli PARONA, avviò il primo suo lavoro scientifico con lo studio dell'*Anchilostoma* del gatto.

Non sono io che debbo esaminare i vari settori della vastissima produzione scientifica: altri colleghi più competenti nei singoli rami, lo faranno tra breve. Io debbo limitarmi, se mi sarà possibile, a trovare nelle sparse file il collegamento dell'unitario spirito scientifico: ma proprio per questo va subito rilevato che già in questo primo lavoro, che può chiamarsi scientifico, GRASSI trova genialmente, nel metodo comparativo, la base per raggiungere un risultato positivo. Egli studia l'anchilostomiasi del gatto per indagare quella umana: la scoperta dell'uovo nelle feci gli prospetta la possibiltà, come farà di lì a poco, di trovare un mezzo diagnostico per accertare la presenza dell'*Anchilostoma* dell'uomo.

Nella memoria: «Sui protisti endoparassiti» che è del 1881, prima cioè che andasse in Germania, scrisse alcune frasi, spiccatamente significative per ben definire il suo pensiero «Questa memoria è essenzialmente un capitolo di parassitologia la quale forma un ramo della patologia comparata» e poi «Come esiste un'Anatomia Comparata che prescindendo dai bisogni del pratico, forma un corpo ed un'anima sola con l'Anatomia Umana, così vive una Patologia Comparata che è unum et idem con la Patologia Umana, o Sperimentale, o Generale che si voglia dire» e ancora «la Patologia, se forte non m'inganno, non si giova quanto potrebbe della comparazione; la comparazione nelle scienze mediche debbesi ritenere la strada maestra per giungere ad un vero alquanto comprensivo».

Queste poche frasi ci dimostrano non soltanto quanto GRASSI sentisse il valore del metodo comparativo, ma anche, l'analogia che vedeva, nell'educazione comparativa, tra i procedimenti dell'Anatomia Comparata e quelli della Patologia Comparata, collegata questa alla Parassitologia.

Non credo di essere in errore se indico nella parassitologia comparata la base fondamentale delle ricerche parassitologiche di Grassi dalle prime fino a quelle famose, sulla malaria.

Ma se la comparazione fu il procedimento che lo guidò e lo sorresse co-

stantemente nella sua lunga vita scientifica è assai istruttivo, per gli insegnamenti che se ne possono trarre, analizzare il suo modo d'intenderla. E questo è tanto più necessario quanto meno GRASSI ne fissò la base teorica. La comparazione non è dunque esposta in precetti sistematici, ma è direttamente e intensamente vissuta nell'opera compiuta. E diremo subito che la comparazione di GRASSI non deriva affatto dall'educazione o imitazione gegenbauriana: la comparazione di GEGENBAUR è esclusivamente morfologica e prescinde deliberatamente da ogni attributo fisiologico: perchè le condizioni fisiologiche esprimenti rapporti attuali venivano considerate da GEGENBAUR come ostacolanti la ricerca filogenetica. Ciò facendo il grande anatomico tedesco non si accorgeva che veniva a prescindere da un elemento che è fondamentale proprio nella comparazione: quello di necessità.

Se ci atteniamo all'opinione comune, che è anche esperienza e buon senso, quando diciamo che lo spirito umano cerca la conoscenza con la comparazione, diciamo che cerca di conoscere le cose uguali come discernere quelle diseguali, e HEGEL già al principio dell'800 rilevava che su questa via si sono fatte molte importanti scoperte specialmente nell'anatomia e nella grammatica comparata.

Certo non possiamo, nè vogliamo, impelagarci nella questione se ci sia identità tra procedimento filosofico e procedimento comparativo e neanche se questi siano immediatamente una cosa medesima, ma nessuno può disconoscere che il metodo comparativo, saggiamente impiegato, porta a conoscere sia ciò che è identico e come è identico, sia ciò che è differente e come è differente, ed ancora, se ci rivolgiamo al divenire di un processo, come l'identico si differenzi e il differente si identifichi. E' stato rilevato (B. SPAVENTA) che non si chiamerebbe certo ingegno acuto nè profondo chi sapesse solo comparare degli oggetti immediatamente affini, ma «noi vogliamo nella differenza la identità e nella identità la differenza. Questa è l'esigenza dell'opposizione».

Non vogliamo discutere (ci basta quello già detto in principio) il concetto filosofico, se la conoscenza delle cose in quanto opposte sia più concreta e profonda delle cose in quanto diverse, ma mi sembra assai giusto, e proprio in biologia, considerare che il metodo comparativo nell'accertare le differenze mirò contemporaneamente ad affermare la necessità di queste differenze.

Non è superfluo riportarsi con il ricordo a questo sviluppo del movimento scientifico, quando il ricercatore non disdegnava l'impiego dei procedimenti logici, e sapeva discutere sulla loro valutazione. Oggi, siamo in tutt'altro clima; da una parte, una larga corrente fra i filosofi crede di poter fare a meno, nel dissertare sui problemi della conoscenza, di ogni preparazione scientifica (il rappresentante più cospicuo di questa corrente è stato il CROCE), dall'altra, la maggioranza degli uomini di scienza, presi dalla specializzazione, rifuggono da ogni analisi dei problemi della conoscenza e purtroppo anche dall'esatta valutazione dei procedimenti logici e quindi in ultima analisi dall'ausilio dei procedimenti critici.

Abbiamo poc'anzi messo in risalto l'enorme valore del metodo comparativo: è chiaro che il suo impiego vale solo se congiunto all'indirizzo critico. E' evidente che il diverso, se giunge all'opposto, mostra il culmine della differenza e della necessità della differenza. L'asserzione del filosofo: « Questo non poter essere senza il suo non essere » non viene respinto dal biologo, quale semplice giuoco di vane parole: il biologo ne osserva la validità nell'esperienza dei fatti, compresi nel suo dominio, in tante comparazioni, purchè queste mirino a qualche cosa di essenziale: le funzioni del parasimpatico le comprendiamo nella coesistente opposizione del simpatico nella innervazione antagonista di un determinato viscere, e nei suoi aspetti immediati lo si comprese all'inizio del dibattito, nel comportamento antagonista tra lo sviluppo a mosaico e quello regolativo dei primi blastomeri: e passando ad un argomento ancora più generale, il biologo trova che la migliore espressione del concetto di vita si trova nell'opposizione con ciò che non è più vita, cioè nella morte.

Ma d'altra parte, l'espressione « questo non poter essere senza il suo non essere » è un concetto dialettico che non esaurisce tutta l'esperienza: la comparazione morfologica e biologica è lì a dimostrare, con l'eloquenza inoppugnabile dei fatti, che essa non solo può mettere in evidenza l'assenza completa di una qualità, ma tante volte, anzi nella maggioranza dei casi, tante tappe successive di una graduazione della qualità considerata. In biologia, e non solo in biologia, distinto non significa necessariamente opposto.

In tutta l'opera di GRASSI, di parassitologo e di biologo, l'esigenza di affermare la necessità delle differenze (e delle somiglianze) è implicita nei risultati raggiunti; perchè solo l'esperienza concepita e attuata con la massima obbiettività, intesa ad analizzare condizioni attuali può, in realtà, controllare questa necessità. E tutto il suo spirito, scientifico ed umano, mirò ad indagare ciò che in biologia è essenziale come necessità e questa necessità scorse non solo nei più ardui problemi scientifici, ma, altresì, in quelli umani, perchè sempre vide le necessità dominanti nei bisogni funzionali. Il grande scienziato non volle nè seppe dissociarsi dall'uomo generoso, commosso dallo spettacolo della profonda miseria degli umili contadini della campagna romana, affranti dalle febbri malariche.

GRASSI nel 1883 frequentò in Germania l'Istituto di GEGENBAUR, poco prima di occupare la Cattedra di Catania (1). Il lavoro sullo sviluppo della colonna vertebrale dei Teleostei che ne rappresenta il frutto, è certo uno dei lavori più importanti scritti sull'argomento, avendo chiarito l'origine del corpo vertebrale nella distinzione tra vertebra primaria e vertebra secondaria. E' pertanto un lavoro di grande interesse, ma è pur sempre un lavoro di derivazione della scuola di GEGENBAUR, quindi un lavoro puramente morfologico e, come

(1) Per una più ampia esposizione dell'opera scientifica di B. GRASSI rimando al discorso pronunciato all'Accademia dei Lincei — GIULIO COTRONEI: BATTISTA GRASSI. *Problemi attuali di scienza e cultura* — Accademia nazionale dei Lincei - 1954.

ho avuto modo di far risaltare anche di recente, questo lavoro non è quello che meglio esprime, o che può esprimere, il temperamento scientifico di GRASSI nè, tanto meno, lo possiamo considerare tra i suoi più significativi.

Con questo non vogliamo dire che il soggiorno in Germania non lasciò in lui una traccia duratura: ma specialmente questa traccia rimase nel GRASSI come professore. I suoi corsi di Anatomia Comparata sempre si uniformarono, per quanto riguardava la morfologia dei vertebrati con riferimenti all'uomo, sul modello di quelli di GEGENBAUR; ma, anno per anno, era andato arricchendo i suoi corsi con lo svolgimento di tanti e tanti argomenti fondamentali della biologia moderna.

E che queste mie considerazioni non siano arbitrarie illazioni si desume dall'evidenza dei fatti.

Tornato dalla Germania e nominato poco dopo, nel novembre 1883 professore di Zoologia e di Anatomia Comparata nell'Università di Catania, GRASSI lascia in disparte gli studi miranti esclusivamente ai significati morfologici e riprende il ciclo delle ricerche su cui si era avviato a Pavia. Infatti nel periodo catanese approfondisce gli studi sugli Elminti e mentre a Pavia (1881) aveva illustrato il ciclo diretto, senza ospiti intermedi, dell'*Ascaris lumbricoides*, a Catania indagò profondamente i cicli biologici di molte Tenie, pervenendo alla singolare scoperta, che pareva contraddire a una legge generale per le Tenie, che la *Tenia nana* si trasmette all'uomo direttamente senza ospiti intermedi. Nel rintracciare tanti cicli biologici GRASSI poggiò su indagini di faunistica comparativa, basata sul metodo che svilupperà in seguito, della limitazione delle forme sospette.

Non v'è dubbio che la serietà dell'educazione scientifica, la vasta cultura, il saggio impiego del metodo comparativo ebbero la loro favorevole influenza nel raggiungere tanti risultati importanti e inaspettati, ma sopratutto brilla in queste ricerche il genio intuitivo, che, fra le varie possibilità, trova quella giusta. In queste ricerche, di natura comparativa, quello che spicca è l'indirizzo biologico nel definire essenzialmente i rapporti tra ospiti e parassiti e da questi rapporti dedurre (o intuire) la possibilità di determinati ospiti intermedi o la possibilità, senza mai legarsi ad apriorismi inibitori, di un ciclo diretto. In tutte queste indagini GRASSI si valse sia dello studio anatomico come di quello istologico ed embriologico che ebbero una influenza determinante sui risultati. Il suo indirizzo biologico contemplava l'armonica cooperazione dei diversi metodi d'indagine ed egli usufruì infatti di una preparazione veramente eccezionale per i suoi tempi.

Il GRASSI, con questo indirizzo zoologico-biologico, mira, oramai, ad indagare problemi della specificità non limitata però alle questioni puramente sistematiche, ma rivolte a delineare i cicli liberi e parassiti servendosi della sistematica biologica.

Questo genere di ricerche, in cui rifulse il suo genio, era destinato a cul-

minare nelle famose scoperte sulla malaria che rappresentano il trionfo del metodo e dell'indirizzo seguito dal Grassi.

Egli, teniamo a metterlo in risalto, ebbe l'esatta percezione dell'importanza fondamentale, per la soluzione di tanti elevati problemi biologici, che assume la completa ricostruzione dei cicli biologici, dall'uovo alla forma adulta, quando le indagini ecologiche si fondono intimamente con quelle morfologiche e fisiologiche: gli studi sulle Termiti con la determinazione delle caste, quelli sulle metamorfosi dei Murenoidi, quelli sui cicli delle Filosserine e sulla malaria, ne sono chiara documentazione.

Negli studi delle Termiti affrontò per il primo un arduo tema di biologia generale con l'analisi della determinazione epigenetica delle caste. Sul tema, quasi inesplorato, delle metamorfosi dei Murenoidi riuscì a ricostruire dall'uovo alla forma adulta i cicli biologici di numerose specie: scoprì il ciclo dell'Anguilla anche se, proprio su questa forma, non giunse a rintracciare l'uovo, ma ebbe la grande soddisfazione di dimostrare che il *Leptocephalus brevirostris* è la larva dell'Anguilla. In queste, come in tutte le sue ricerche, Grassi dimostrò che non basta lo studio di una singola fase biologica per chiarire un problema, ma che quella stessa fase si definisce solo nel quadro di tutto il ciclo.

Questo stesso rigore di analisi e genialità di intuizione Grassi portò nella ricostruzione, a base comparativa, dei cicli delle fillossere e specialmente nella ripresa (a Roma) delle ricerche sulla malaria.

Come abbiamo già accennato, sempre egli cercò nell'analisi comparativa di valutare le diverse qualità biologiche delle forme affini ed è in questa tenacia d'indirizzo, valorizzato dal suo prodigioso intuito, che consiste il vero segreto delle sue grandiose conquiste.

Solo chi tiene presente ciò che di unitario collega tutta l'opera scientifica di Grassi è in grado di spiegare le sue scoperte nei più diversi campi della biologia. Molti dei suoi lavori solo a distanza di anni palesarono la loro reale importanza. Così il lavoro sui Pappataci, in cui egli rintracciò i cicli biologici di parecchie specie, con la scoperta delle uova e delle larve, illustrandone, sopratutto, le condizioni ecologiche. Oggi si è in grado di valutare l'importanza di questo lavoro per la profilassi contro le leismaniosi, ma non si pensi ad una semplice fortunata coincidenza. Grassi volle approfondire la biologia dei pappataci perchè, e da tempo, aveva intuito la loro importanza parassitologica.

I medesimi procedimenti di indagine, basati sulla comparazione biologica e sulla ricostruzione dell'intero ciclo biologico rifulsero nello studio sulle fillossere. Anche qui Grassi dinanzi all'immane lavoro che sapeva di dover compiere, non si disanimò, e l'indagine comparativa lo guidà quando per lo studio della fillossera della vite si valse di « inattese scoperte sulla fillossera della quercia ».

Abbiamo sorpassato, con il ricordo di questi lavori, il periodo delle sco-

perte romane sulla malaria. Non sarò io a riferire su queste scoperte, ma non posso non rilevare che esse segnano la felice sintesi di tutte le qualità scientifiche di GRASSI e ci documentano insieme lo spirito scientifico e quello umano del grande biologo, perchè rappresentano il glorioso coronamento, pur tra tante aspre lotte, di una vita umana rivolta unicamente al trionfo della verità e al raggiungimento di alte finalità sociali. E che queste scoperte rappresentino il frutto del suo indirizzo biologico e parassitologico lo si desume dal titolo della famosa monografia del 1901 « Studi di uno zoologo sulla malaria ». E volendo soltanto far risaltare lo spirito unitario del suo pensiero col resto della sua imponente produzione mi preme riportare alcune sue frasi del 1911 atte a collegare le scoperte sulla malaria con le antiche ricerche sui Cestodi e sui Nematodi: « Ricondotto da BIGNAMI e da KOCH all'ipotesi che la malaria fosse trasmessa da animali succhiatori di sangue (ipotesi che egli aveva parecchi anni prima abbandonata in seguito ad esperienze negative fatte col *Culex pipiens*), applicando il metodo delle ricerche faunistiche comparative per la limitazione degli ospiti intermedi, — da lui proposto ed usato con successo per i Cestodi e i Nematodi fin dal 1892 — dichiarò a *priori* molto sospetto come trasmissore dei parassiti malarici l'*Anopheles claviger,* mentre escluse in modo assoluto qualunque partecipazione del *Culex pipiens*. Dopo di che passò a dare, in collaborazione con BIGNAMI e G. BASTIANELLI, le prove sperimentali del suo asserto, e venne (in parte con loro, in parte da solo) alla conclusione, dovunque confermata, che la malaria in Europa viene trasmessa *esclusivamente* dagli anofeli e precisamente da tutte le specie di questo genere, e che gli anofeli nascono non già infetti, ma s'infettano soltanto pungendo l'uomo malarico », ed è sempre GRASSI che dice, nell'ultimo suo discorso (1924) « Io ebbi la fortuna di pensare che se la malaria veniva propagata dalle punture delle zanzare, come asseriva BIGNAMI, dovevano entrare in scena zanzare speciali. Rintracciai queste zanzare speciali e le sperimentammo (GRASSI, BIGNAMI e BASTIANELLI) ».

In questi due eloquenti brani quanta luce sul pensiero, sulla personalità, sull'animo adamantino di GRASSI. Dal lontano richiamo di quel metodo comparativo applicato fin dal 1892 alla parassitologia per la delimitazione delle forme sospette, (e così genialmente collaudato a Roma nel 1898 nel delimitare il campo degli insetti succhiatori di sangue, onde passare con possibilità di successo alla sperimentazione diretta), all'intuizione di zanzare speciali atte a trasmettere la malaria; dal rigoroso suo procedimento (già realizzato nella ricerca di tanti cicli, da seguire in tutte le fasi di sviluppo) ora applicato nei rapporti tra parassiti malarici e Anofeli trasmettitori, all'approfondito studio ecologico di tanti insetti succhiatori di sangue, si ritrova la mentalità, l'educazione scientifica, la profonda preparazione, l'ostinata tenacia; ma sopra ogni cosa la genialità d'intuizione, quella medesima genialità di cui aveva dato prova nel raggiungere tante radiose scoperte.

E' proprio il caso di dire che Grassi negli studi sulla malaria non superò se stesso, ma fu soltanto se stesso.

Ma c'è un punto che merita di essere chiarito. Abbiamo e a ragione, insistito sull'intuito di Grassi, che è certamente il fulcro del suo spirito scientifico. Ma è bene analizzare qualche aspetto un po' negletto: l'intuito di Grassi non ha a che fare con la pretesa genialità degli improvvisatori; niente di più odiò Grassi che la presuntuosa faciloneria, e per la serietà, sopratutto, ammirò la scienza tedesca: il suo intuito non si distaccò mai dal tenace lavoro, dalla severità della critica, dalla continua verifica delle varie possibilità, senza preoccupazione di abbandonare idee già da lui sostenute, sino al raggiungimento della verità.

Proprio per la ricerca delle « zanzare speciali » che è uno dei suoi maggiori contributi alla scienza, troviamo il terreno propizio all'analisi che ci interessa. Egli stesso riconosce che nel periodo catanese aveva abbandonato l'ipotesi delle zanzare in seguito ai risultati negativi avuti col *Culex pipiens*. Quando a Roma riprese l'argomento della malaria il risultato negativo fu rivisto alla luce di nuove osservazioni. Il Ficalbi, zoologo di Pisa, aveva da breve tempo pubblicato ricerche sistematiche ed ecologiche sulle zanzare, ricerche che così vengono valutate da Grassi, con la sua scrupolosa onestà scientifica « i suoi lavori (di Ficalbi) intorno ai culicidi hanno iniziato le ricerche moderne sulla sistematica di questi ditteri, e facilitato molto gli studi indiziari per la ricerca dell'insetto trasmissore della malaria ». Il nome di Ficalbi, anche se quest'autore rimase estraneo al problema malarico, non deve quindi essere dimenticato, proprio per l'aiuto dato a Grassi. E qui cadrebbe opportuno il rilievo come le verità scientifiche si chiariscono con una catena di risultati: infatti Grassi sulla scorta delle ricerche di Ficalbi fece una prima analisi sulla distribuzione e prevalenza delle zanzare esistenti in luoghi malarici e in luoghi non malarici, e fu quest'analisi che gli fece intuire la necessità di rintracciare e poi sperimentare con le « zanzare speciali ».

E così egli avverte: « Rintracciai queste zanzare speciali e le sperimentammo ». L'intuito ebbe modo di manifestarsi nella limitazione delle forme sospette, nello scegliere cioè quelle poche forme di zanzare con le quali sperimentare. Nella ricerca sperimentale è assai difficile, per non dire impossibile, tentare tutte le vie: bisogna saper scegliere, ed in questo si palesa lo spirito scientifico. Non aveva forse ammonito Spallanzani: sperimentare comunque è mestiere di tutti, sperimentare a dovere fu e sarà sempre mestiere di pochi?

Non mancò chi osò asserire che il merito di Grassi si ridusse ad una semplice questione di classificazione, ossia di sistematica zoologica: ma il lavoro sistematico era stato, almeno all'origine, quello di Ficalbi; il merito di Grassi era ben altro, era di aver capito come la questione sistematica zoologica poteva assurgere, nel caso in esame, alla risoluzione di una fondamentale questione biologica e parassitologica. La questione zoologica, nella mente di Grassi, im-

pegnava un alto quesito biologico, quello della specificità del parassitismo. Grassi capì e risolse brillantemente il quesito, sulla scorta della sua fondamentale preparazione generale, dominata questa dal genio intuitivo.

Il problema della specificità, come fu visto da Grassi, e questa visione permise la scoperta, è un'altra prova della sua obbiettività: l'ipotesi doveva essere verificata dall'esperienza: ma egli solo tra i parassitologi e malariologi del suo tempo aveva quella preparazione zoologica che poteva condurre al successo: ed è questo che chiarisce ogni cosa e illumina ogni oscurità, anche quelle artificiosamente create.

Nei disordinati tentativi per risolvere la trasmissione della malaria umana, Ross aveva pensato ad una specificità, ma su una impostazione generica quanto errata; poichè supponeva che ogni forma di malaria fosse trasmessa da una speciale zanzara, e sulla base delle ricerche riteneva trasmissore della terzana quel *Culex pipiens* che Grassi aveva dichiarato innocuo. E' superfluo rilevare il semplicismo inerente a questo schematico, quanto, nel caso in esame, erroneo modo di considerare le specificità.

In conclusione Ross pur sospettando la trasmissione della malaria umana ad opera di zanzare (e tale sospetto era stato già avanzato da gran tempo dal Lancisi e ripreso da altri) non riuscì a darne la documentazione obbiettiva proprio perchè non seppe orientarsi nel labirinto delle questioni inerenti alla specificità, fuorviato sia dalla visione erronea, sia dalla mancanza di quella preparazione biologica e zoologica che eccelleva nel Grassi. Fu così che Grassi, coi suoi collaboratori (Bignami e Bastianelli dapprima e poi da solo) riuscì a dare la dimostrazione che la specificità di trasmissione bisognava intenderla riferita a tutto il genere «anofele». Il metodo comparativo gli insegnava di trovare le differenze biologiche nelle somiglianze tra le zanzare, mentre la stessa forma di «anofele» poteva trasmettere i differenti plasmodi malarici. Questo fu, alla luce obbiettiva dei fatti dimostrativi, l'esatta valutazione della specificità della trasmissione malarica; in parte così notevole contenuta nell'intuizione di Grassi balenata nella sua mente sui dati offertigli dalla lettura delle osservazioni di Ficalbi. Non ci sono altri aspetti misteriosi nè ragioni occulte: tutto oggi è chiaro e sicuro!

Ma conviene riguardare un altro punto riferentesi ad altre induzioni erronee: si sono tirati in discussione, quando i ricercatori romani avevano illustrato l'intero ciclo nell'anofele, quattro reperti coi quali Ross pretese di aver dato lui la dimostrazione: quei reperti, oggi, dimostrano soltanto che Ross sospettava, e nessuno vuole contestargli il merito, che nella malaria umana doveva esserci un ciclo identico a quello degli Uccelli, ma, ed è ovvio, per ricostruire dimostrativamente un ciclo biologico bisogna rintracciare e collegare tutte le varie fasi e che tutto venga reso evidente dalla trasmissione sperimentale. E questo lo fecero, senza più dubbi in proposito, soltanto Grassi, Bignami e Bastianelli.

Questo cruciale esperimento dimostrò che un uomo non malarico, in luogo non malarico, punto da un anofele reso sperimentalmente infetto, può infettarsi di malaria.

In tutto questo sviluppo di indagini ritroviamo, nel GRASSI, come ho già ricordato, il ricercatore, che sia nei parassiti, sia nelle forme libere, mira a valutare uno stadio biologico nel quadro dell'intero ciclo biologico: perchè sa che soltanto così può identificare una forma biologica e sa pure che solo la verifica sperimentale ci può documentare l'esattezza della ricostruzione di un ciclo. Il GRASSI, come egli stesso ha lasciato scritto, risaliva, nella malaria umana, a quel cammino proficuamente percorso negli studi sui Nematodi e sui Cestodi. Come mai l'evidenza dei fatti fu calpestata, or è più di mezzo secolo, da una bene orchestrata campagna di denigrazione, non è qui il caso, oramai, di insistere; basta ripetere la frase di GRASSI: « la verità non si estingue ».

Coloro che lo avversarono così ferocemente e così ingiustamente, non si accorsero, o non vollero accorgersi, che i loro attacchi erano destinati a infrangersi contro quella verità che poggiava sul glorioso passato del grande scienziato. Infatti tutto il passato scientifico dimostrava nel GRASSI l'eccezionale studioso che poteva risolvere quei quesiti che in realtà lui solo risolse, perchè egli era un grande parassitologo essendo contemporaneamente grande zoologo e grande biologo e aveva creato una parassitologia biologica. Ecco perchè potè trattare magistralmente i problemi della specificità dei parassiti.

Sembra quasi incredibile che un uomo solo abbia potuto condurre a termine un edificio così maestoso: ma per spiegarlo dobbiamo ricorrere non soltanto alla rapidità del suo genio intuitivo ma alla sua indomabile passione. Ed è in questa passione per la scienza che si palesano le qualità più elevate della sua anima.

L'ansia della ricerca, come io conobbi e vidi in GRASSI nei lunghi anni che vissi a lui d'accanto, non l'abbandonava mai, e mai l'interesse personale e le ambizioni e le vanità umane poterono far presa su di lui e farlo deviare dalla strada prescelta. E per la ricerca affrontò sacrifici e pericoli che sembrano leggendari. Solo tenendo presenti, e non dissociati, il suo genio e la sua generosa anima, possiamo spiegare la sovrumana energia di lottatore nella strenua lotta che durò tutta la vita, contro l'ignoto a favore del progresso umano e per la difesa igienica e la redenzione dei più umili.

Abbiamo cercato di riassumere lo spirito scientifico di GRASSI; spirito che manifestò anche, e potentemente, nella sua opera di maestro. Egli amò la scuola con lo stesso infinito amore che portò alla scienza. Capiva, come pochi, le aspirazioni più nobili dei giovani studiosi e mirò, sopra ogni cosa, nella sua opera di maestro, a far sviluppare la personalità degli allievi. E che egli spregiasse le imposizioni dottrinali dei maestri improvvisati, più ligi al culto delle proprie opinioni che al libero progresso della scienza lo possiamo desumere

da queste parole che pronunciò nell'ultimo discorso del 1924, pochi mesi prima della morte: « Esorto perciò i giovani a non ricorrere ai consigli di chi ne sa più di loro, nella scelta del campo da coltivare. Seguano gli impulsi della loro mente, tenendo presente che l'ingegno italiano è essenzialmente fatto di nuove iniziative. Noi biologi abbiamo già sciupato troppo tempo imitando ciò che si fa all'estero: all'estero possiamo spesso imparare la metodica, alla quale gli italiani in genere sono meno proclivi, ma quanto alla scelta della meta verso cui dirigersi è sempre preferibile quella da noi intuita, quella che germoglia allo splendore del sole italiano ».

Questo incitamento che Grassi rivolse ai giovani, al termine della sua vita, fu variamente interpretato e non mancarono le critiche, sembrando che Grassi volesse disconoscere la saggia influenza dei maestri. Ma chi così mal giudicava mostrava invece, di nulla conoscere dello spirito di Grassi e d'ignorare la venerazione che egli aveva per i veri maestri e la sua stessa opera di maestro.

In quelle parole rivolte ai giovani Grassi sentiva di riassumere tutta la sua vita di studioso: richiamava le ansie e le speranze della giovinezza, le prime incertezze sulla via da scegliere. Voleva anche ricordare gli anni che considerava sciupati quando nella ricerca degli alberi genealogici aveva voluto seguire le idee dominanti.

Ma in quelle parole vi scorgiamo anche un grido di liberazione e di vittoria: liberarsi dall'umiliazione servile ed essere sopratutto sè stessi, nella scienza come nella vita.

Battista Grassi fu sopratutto sè stesso e la sua figura non può essere paragonata a quella di nessun altro, tanta è l'originalità e l'ampiezza della sua opera. Forse egli solo può assidersi nella considerazione dei posteri accanto a Marcello Malpighi e a Lazzaro Spallanzani.

Con il suo genio intuitivo risolse assillanti problemi nei più diversi campi della Biologia e mirò con lo strenuo lavoro a lenire le miserie degli umili. Volle e potè dimostrare che la scienza deve tendere al progresso e al benessere dell'Umanità.

Il suo genio non si può ereditare; ma vi sono le altre sue qualità: la tenacia nel lavoro, l'obbiettività senza apriorismi, la coscienza adamantina, il disprezzo per la faciloneria, il rispetto per la personalità dello studioso. Queste qualità che egli ebbe in modo eminente cercò di trasfondere nei suoi allievi. Non è il caso di rilevare se tutti ne furono degni, ma sia consentito a me, qui in questa stupenda terra lombarda che lo vide nascere e avviarsi alla gloria, di proclamare che il suo insegnamento non potrà essere dimenticato, perchè egli continuerà ad ammonire e ad insegnare nei secoli!

L'OPERA PROTOZOOLOGICA DI BATTISTA GRASSI ALLA LUCE DEGLI ODIERNI SVILUPPI DELLA SCIENZA

Augusto Corradetti (*)

Battista Grassi ha lavorato nel campo della protozoologia si può dire per tutta la vita. Da giovanissimo inizia gli studi sui protozoi intestinali, e, nella maturità, affronta due grandi problemi che in mezzo alla sua multiforme attività non abbandona praticamente più fino alla morte: i flagellati delle termiti e i plasmodi della malaria.

Allo studio della protozoologia, come a quello della parassitologia in genere, Battista Grassi è stato spontaneamente attratto dal suo stesso pensiero. La genesi di questa attrazione è da lui stesso rivelata con le seguenti parole che premetteva alla sua monografia sui protisti endoparassitici del 1882: «Ricordo che quando, studente ancora, frequentava il corso di patologia generale, veniva preso da una forte curiosità di sapere perchè non si comprendesse nella patologia lo studio delle malattie di tutti quanti gli animali. E, quando vidi che il patologo sperimentale tentava di riprodurre le malattie dell'uomo nelle rane e nei conigli, ho domandato perchè non si studiassero anche le rane e i conigli, e non questi animali soli, quando *ammalavano naturalmente*. La mia curiosità e la mia domanda allora restarono insoddisfatte. Da quel tempo sono corsi sei anni: e niente mai mi diede a divedere che i miei dubbi di allora fossero irragionevoli. Sembrerebbe che molti credessero le malattie triste retaggio del solo uomo: od almeno giudicassero le malattie dell'uomo senza relazioni con quelle degli altri animali». «Mi sembra di aver nettamente delineato il mio intendimento; esso mira a un'estensione della patologia, molto al di là degli stretti confini, dentro i quali oggidì vuolsi contenere: la patologia, se forte non m'inganno, non si giova quanto potrebbe della comparazione: la comparazione nelle scienze mediche debbesi ritenere la strada maestra per giungere a un vero alquanto comprensivo». «Questo mio lavoro è fatto in conformità alle idee dianzi esposte. Lo scopo a cui mirai direttamente è stato la conoscenza di alcuni Protisti parassiti dell'uomo: per apprezzarli il meglio a me possibile li ho studiati oltrechè nell'uomo in svariate classi animali».

Se fermiamo un momento l'attenzione sul fatto che queste idee venivano concepite nel 1875 ed espresse in una monografia ricca di materiale probativo datata «ottobre 1881», dobbiamo riconoscere che B. Grassi si era avvicinato agli studi protozoologici con lo spirito di un vero pioniere che intenda porre basi solide a una materia ancora in via di formazione.

E basi solide sono poste con tutta chiarezza nelle conclusioni della monografia stessa, là dove B. Grassi si sofferma sulla dottrina parassitaria delle

(*) *Istituto Superiore di Sanità.*

infezioni e ne fissa il valore entro i suoi veri limiti con queste parole: « Accogliamola (la dottrina parassitaria), non dimentichiamo però che è una teoria, cioè un vero forse provvisorio. Con altre parole, per non esser travolti e sommersi dall'empito delle esagerazioni, prepariamoci alla possibiltà di doverla modificare ». « Ciò che possiamo aspettarci di trovare nelle malattie infettive ce lo possono insegnare soltanto considerazioni d'ordine molto più generale ». E qui, dopo aver ricordato che in natura esistono tre diverse forme di convivenza: la simbiosi, il commensalismo e il parassitismo, Egli conclude che non si possono « considerare i parassiti causa delle malattie che comitano senza darne una congrua dimostrazione, perchè si possono scambiare gli amici coi nemici ». E applicando questi principii, divenuti oggi di ovvio dominio comune, egli giungeva a concludere dallo studio del suo materiale che « alcuni Protisti (Coccidi) si hanno a buon diritto per morbipari e però loro sta bene la denominazione di parassiti genuini: il Coccidio è il carnefice, l'oste la vittima. Per altri (Megastomi [oggi Giardie]) sarebbe prematuro il decidere se abbiano un'efficienza morbosa. I restanti (che formano la pluralità) sono organismi che attecchiscono e si moltiplicano sopra un suolo fornito dall'oste (e composto spesse volte di parti solide e liquide tendenti alla decomposizione) senza recargli alcun danno o vantaggio apprezzabile; devonsi perciò appellare commensali ».

Gli studi sui protozoi endoparassitici compiuti tra il 1879 e il 1888, pur appartenendo, come si è detto, a un periodo giovanile, hanno spesso indicato o aperto la strada alle ricerche di successivi sperimentatori. B. GRASSI fu il primo a riconoscere che l'*Entamoeba coli* non è patogena. Numerose specie dei generi *Entamoeba, Retortamonas, Hexamita, Giardia* e altri furono da lui viste o ben differenziate per la prima volta. Per determinare se le Giardie osservabili nell'uomo e in altri animali fossero la stessa secie o specie diverse, istituì esperimenti di infezione crociata che solo a grande distanza di tempo furono ripresi: da DESCHIENS nel 1921, da SIMON nel 1922 e da HEGNER nel 1923 e anni successivi. La questione, che è stata notevolmente controversa per particolari difficoltà tecniche è stata infine risolta nel senso della diversità biologica, e talvolta anche biometrica, di numerose specie del genere *Giardia* osservabili in diversi animali.

Anche per la classificazione sistematica dei protozoi i lavori di questo periodo hanno avuto notevole importanza, come è dimostrato dal fatto che il non averli studiati a sufficienza è costato errori a protozoologi espertissimi. Basterà ricordare che WENYON, che a buon diritto può considerarsi il più grande protozoologo delle ultime generazioni, trovò nel 1917, in collaborazione con O'CONNOR, un flagellato dell'uomo simile ad altri osservati nel 1911 nelle larve di tipulidi e tricopteri per opera di MACKINNON, che aveva creato per essi il genere *Embadomonas*. WENYON e O'CONNOR classificarono il nuovo microorganismo in questo genere senza accorgersi che esso era in tutto identico al ge-

nere *Retortamonas* creato da GRASSI nel 1879 per un flagellato del grillotalpa: lo stesso errore fu ripetuto nel trattato di WENYON del 1926. Fu solo nel 1931-32 che WENRICH, studiando i flagellati del grillotalpa corresse l'errore.

Nel 1885 B. GRASSI pubblicava un lavoro dal titolo: « Intorno ad alcuni protozoi parassiti delle termiti ». In esso egli descriveva un nuovo protozoo flagellato che denominava *Joenia annectens*: osservava che esso era presente in quasi tutti gli individui di *Calotermes flavicollis* e che il protozoo si nutriva di tritumi di legno. In successivi studi sulle termiti mise in evidenza i rapporti tra la presenza dei protozoi e la maturazione degli organi genitali degli ospiti e provò sperimentalmente che singole termiti prive di protozoi, allontanate dalle altre, difficilmente potevano mantenersi vive: ne dedusse quindi la possibiltà che i protozoi coadiuvassero la digestione delle termiti, il che fu in seguito universalmente confermato.

Nel 1904 GRASSI ritorna sull'argomento in collaborazione con la FOÁ,: riconosce nella *Joenia annectens* due specie di due generi distinti e descrive il processo di riproduzione che appare del tutto peculiare. Nel 1911 pubblica, sempre con la FOÀ, un vasto complesso di ricerche morfologiche e biologiche sui flagellati delle termiti e pone le basi della classificazione di queste forme includendole nell'ordine *Hypermastigina*. Ancora altri lavori sull'argomento vengono compiuti negli anni successivi e sotto la sua direzione dalla FOÀ e dal JANICKI. Infine nell'ultimo e più complesso lavoro del 1917 « Flagellati viventi nei termiti », GRASSI dà l'accurata descrizione di molte specie e varietà appartenenti a ben 14 generi: con questa monografia, per la quale fu studiata una grande quantità di materiale raccolto da SILVESTRI nei suoi viaggi per il mondo, B. GRASSI concludeva un'opera che ben può definirsi monumentale sul gruppo di protozoi indubbiamente il più complicato e difficile per lo studio.

Molti altri studiosi si sono in seguito occupati degli *Hypermastigina*. Ricorderemo KOFOID e SWEZY (1919), IMMS (1919), CUTLER (1919-1921), DE MELLO (1919-1921), KOIDZUMI (1921), KIRBY (1924-1933) DUBOSCQ e GRASSÈ (1927-1933), BROWN (1930). Sopra tutti ricorderemo CLEVELAND e collaboratori della Harvard Medical School di Boston, che dopo circa 12 anni di ricerche, hanno pubblicato nel 1934 una poderosa monografia dal titolo « The wood-feeding roach Cryptocercus, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach » e hanno sentito il dovere di dedicarla a « Battista Grassi, who first called attention to the complexity and diversity of the Hypermastigina ».

* * *

BATTISTA GRASSI inizia lo studio dei parassiti malarigeni intorno al 1888-89, quando erano già comparsi i lavori di LAVERAN, di MARCHIAFAVA e CELLI, e il primo lavoro di GOLGI. Malgrado le ricerche di questi grandi studiosi, da più parti ci si domanda ancora, nel 1888, se ci si trovi di fronte a veri parassiti. E la domanda appare legittima, perchè il nucleo non si vede, non si riesce a

differenziare con i comuni colori di laboratorio. Questa obiezione è tanto forte che anche GRASSI è tra gli scettici. Ma dopo le nuove ricerche di GOLGI del 1889, GRASSI in collaborazione con FELETTI affronta personalmente il problema, e gli riesce di mettere in evidenza il cariosoma nucleare, mescolando a fresco il sangue con una soluzione di bleu di metilene e di fucsina. La prova istologica che si tratta di un protozoo è finalmente data, anche se, come gli Autori stessi riconoscono, il metodo è inadeguato, in quanto il colorante agisce senza previa fissazione. Tuttavia questa prova è certa perchè, come farà notare GRASSI più tardi, il metodo, per quanto inadeguato, « non avrebbe potuto creare il nucleo se esso non fosse esistito ».

Dimostrato che i parassiti della malaria sono veramente protozoi, vediamo GRASSI tornare immediatamente al prediletto metodo comparativo. Insieme con FELETTI pubblica dal 1890 al 1892 una serie di lavori sui parassiti malarigeni degli uccelli e dell'uomo. Distingue nel passero la *Laverania* (= *Haemoproteus*) dall'*Haemaboeba* (= *Plasmodium*) e di quest'ultima descrive i successivi stadi e le forme di segmentazione. Osserva che i così detti corpi flagellati non si trovano mai nel sangue circolante, ma solo nel sangue estratto dal corpo del vertebrato. Descrive altre forme di plasmodi nella civetta e nel falco. Ritorna nuovamente all'uomo e dimostra che i parassiti malarigeni umani sono specie distinte, e non varietà di una stessa forma capaci di trasformarsi l'una nell'altra. La prova è sperimentale: il dr. CALANDRUCCIO che non ha mai avuto malaria, si inocula sotto cute un grammo di sangue di quartanario e 18 giorni dopo presenta un tipico attacco di quartana con *P. malariae* nel sangue. Altri sei esperimenti successivi (due eseguiti dal prof. DI MATTEI e quattro dal CALANDRUCCIO) riproducono sempre la forma iniettata (terzana, quartana, estivo autunnale) con i rispettivi tipi di parassiti.

Questo complesso di contributi sui parassiti della malaria è stato particolarmente fecondo di sviluppi e ha determinato un'enorme produzione scientifica successiva. La dimostrazione dell'esistenza del nucleo ha costituito il suggello finale della teoria parassitaria della malaria, e la distinzione tra *Haemoproteus* e *Plasmodium* l'inizio di una classificazione razionale degli Emosporidi.

Ed eccoci giunti all'opera fondamentale: la trasmissione dei parassiti della malaria umana.

Il tempo ha ormai placato l'accesa polemica con ROSS. Non tratteremo qui nei dettagli l'oggetto di questa discussione poichè ciò è stato fatto con incomparabile equilibrio ed efficacia da SILVESTRI nel 1925 e da COTRONEI quest'anno nella commemorazione di GRASSI all'Accademia dei Lincei. Ci limiteremo a sintetizzare i termini con cui la questione può considerarsi definitivamente chiusa, riconoscendo a ROSS il merito di aver scoperto il ciclo di un plasmodio degli uccelli e prendendo atto di quanto ha obiettivamente esposto in merito l'inglese WENYON: « GRASSI and his co-workers were the first to obtain the absolutely scientific proof of the specific relation of anopheline

mosquitoes to human malaria, and to follow the complete cycle of development of the three human malaria parasites in these mosquitoes ».

Ed ecco lo svolgimento della ricerca: GRASSI parte dal concetto che se la malaria è trasmessa dalle zanzare, e queste vivono tanto in zone malariche quanto in zone non malariche, solo alcune specie sono responsabili della trasmissione, e queste debbono ricercarsi tra quelle presenti nelle zone malariche. In ricerche compiute nell'estate 1898 egli indica tre specie sospette: *Anopheles claviger* (= *maculipennis*), *Culex penicillaris* e *Culex malariae*: esclude invece il *Culex pipiens*. Nell'ottobre dello stesso anno insieme con BIGNAMI infetta di malaria, in luogo non malarico, un uomo sano, sottoponendolo alla puntura di zanzare delle tre specie suddette. Nel novembre concentra i suoi sospetti sull'*Anopheles maculipennis* e il 4 dicembre GRASSI, BIGNAMI e BASTIANELLI annunciano che un uomo non malarico è stato infettato con punture di *Anopheles maculipennis*, e che in questo anofele si son ritrovati i diversi stadi di sviluppo del parassita. Successive note fanno conoscere che anche l'*A. superpictus* l'*A. bifurcatus* e l'*A. pseudopictus* propagano la malaria, e che anche il *P. malariae* si sviluppa nell'*A. maculipennis*. Infine vengono seguiti e descritti tutti gli stadi di sviluppo dei tre parassiti nel corpo dell'anofele.

Mentre questa parte positiva della ricerca viene alla luce in collaborazione con BIGNAMI e BASTIANELLI, GRASSI da solo si sobbarca alla ingrata ma necessaria fatica degli esperimenti negativi. Stabilisce così sperimentalmente che numerose specie di *Cules*, nonchè i *Phlebotomus* e le Serapiche non trasmettono la malaria umana. Conclude quindi che « tutte le specie italiane del genere *Anopheles* propagano la malaria » e restringe a questo genere le specificità dell'ospite invertebrato per i parassiti della malaria umana.

La ricerca è chiara, lineare, condotta con rigoroso metodo scientifico e i risultati ineccepibili.

Ma è proprio dopo la conclusione della scoperta fondamentale che meglio si rivela la straordinaria tempra di GRASSI scienziato.

La scoperta rivela a lui, prima che agli altri, che la malaria è trasmessa dagli *Anopheles* e solo da essi. Ed ecco presentarsi alla sua mente di zoologo e di medico il problema malarico in tutta la sua ampiezza. Ci sono tre specie di plasmodi ciascuno dei quali ha una biologia particolare e dà origine a una malattia di diverso tipo febbrile, di diverso andamento clinico, di diversa gravità. Ci sono gli *Anopheles* che già in Italia sono varie specie e a cui si aggiungeranno a mano a mano, a diecine, le specie malarigene di altri paesi: e ciascuna specie ha un habitat particolare, una biologia particolare. C'è da spiegare una lunga serie di problemi epidemiologici, come la riduzione spontanea della malaria nelle zone bonificate e l'anofelismo senza malaria. C'è infine il problema principe: ora che l'etiologia e il modo di trasmissione della malaria sono conosciuti come eliminare la malattia e preservarne l'umanità?

La scoperta di BATTISTA GRASSI apre un grande campo interamente nuovo,

ed egli vuole essere il primo a gettarsi con entusiasmo su tutte le vie, ben conscio di essere forse l'unico adeguatamente preparato ad affrontare a un tempo tutti i lati del problema. E negli anni tra il 1899 e il 1902 non riposa un istante: raccoglie un'enorme mole di osservazioni e di risultati sperimentali sul ciclo dei parassiti, sulla biologia e sui costumi degli anofeli, sull'epidemiologia della malaria e sull'anofelismo senza malaria, sperimenta su larga scala la profilassi chininica e la protezione meccanica. Pubblica via via i risultati nelle due edizioni della sua monografia « Studi di uno zoologo sulla malaria » (rispettivamente 1900 e 1901) e nei supplementi che continuamente vi aggiunge, finchè dopo il 1902, amaramente colpito dalla incomprensione e dall'ostilità che incontra, cessa temporaneamente di occuparsi di malaria.

Nel 1917, in piena guerra, Grassi sente di dover riprendere lo studio della malaria e di porre le basi scientifiche per la lotta contro questa malattia. Dapprima in collaborazione con Sella e poi coadiuvato dal tecnico F. Neri, prosegue le ricerche sulla malaria che non abbandona più fino alla morte. Sperimenta nuovi metodi di profilassi, specialmente contro le larve, determina le tecniche di applicazione, e riunisce una grande mole di osservazioni e di risultati sperimentali sulla biologia degli anofeli.

* * *

Nell'impossibilità materiale di esaminare compiutamente gli innumerevoli contributi apportati da Battista Grassi al problema della malaria dopo la sua scoperta fondamentale, mi limiterò a richiamare l'attenzione su alcuni punti della sua opera che hanno costituito la base di partenza di successivi importanti sviluppi della scienza malariologica.

Ritornando al ciclo dei parassiti nell'invertebrato, occorre subito dire che la descrizione di Grassi del 1900 è così dettagliata e precisa che ben poco è restato da fare agli autori successivi. Si possono solo citare i lavori di Huff sull'esatta sede di incistamento dell'oocinete e il lavori di Wenyon, e dello scrivente sulle modalità di formazione degli sporozoiti nell'interno delle oocisti.

Riguardo al ciclo dei parassiti nel vertebrato si sono avute invece in quest'ultimo venticinquennio ricerche di grande importanza sullo sviluppo iniziale degli sporozoiti. Ma è stato proprio Battista Grassi il primo, se non a porre le basi sperimentali, almeno ad esporre chiaramente il problema.

Nella seconda edizione degli « Studi di uno zoologo sulla malaria », a pag. 202, egli scrive: « Un'altra curva secondaria del circuito dei parassiti malarici deve esser costituita dalla moltiplicazione degli sporozoiti iniettati dall'Anopheles nel corpo dell'uomo. Certamente questi sporozoiti, come dimostra il loro nucleo, non sono trasformabili direttamente in sporozoiti delle generazioni monogoniche ordinarie (cioè, delle generazioni entro il corpo dell'uomo). Deve avvenire perciò almeno una generazione con caratteri particolari ». E più oltre: « Nel corpo dell'uomo si deve verificare una terza generazione in rap-

porto col principio del periodo d'incubazione, cioè subito dopo l'inoculazione degli sporozoiti ». E nella tavola V della stessa opera egli dà nello schema le figure relative a questo ciclo ponendo accanto un punto interrogativo.

GRASSI ha visto giusto, come oggi sappiamo con certezza. Ma sfortunatamente è intervenuta l'opera di un altro scienziato non per spianare la via alla verità, ma per porvi ostacoli: SCHAUDINN comunica di aver visto in vitro gli sporozoiti penetrare nei globuli rossi e trasformarsi in trofozoiti. L'autorità di SCHAUDINN è tale che tutti si appagano, nessuno controlla, e l'ipotesi di GRASSI viene eliminata e addirittura dimenticata. Infatti quando JAMES espone l'idea che gli sporozoiti dei plasmodi debban tutti svilupparsi, come quelli degli *Haemoproteus*, nelle cellule reticolo-endoteliali, nessuno nota che le basi primitive di questa ipotesi risiedono nell'idea di GRASSI che debba verificarsi un ciclo particolare degli sporozoiti e in quella di GOLGI che i parassiti malarigeni possano svilupparsi in cellule dei tessuti. Si noti bene che le opinioni di GRASSI e di GOLGI erano state enunciate quando ancora DE BEAUREPAIRE ARAGÃO non aveva scoperto il ciclo degli *Haemoproteus* nelle cellule reticolo-endoteliali: dopo questa scoperta era facile a JAMES supporre che anche i plasmodi, così affini agli *Haemoproteus*, si sviluppassero in queste cellule.

L'ipotesi di JAMES veniva sperimentalmente verificata da RAFFAELE, KIKUTH e MUDROW, JAMES e TATE, MANWELL e GOLDSTEIN e altri in varie specie di plasmodi degli uccelli, ma è risultata vera solo per questi. Per i plasmodi dell'uomo gli sporozoiti si sviluppano invece in cellule epiteliali del fegato, come hanno dimostrato SHORTT e GARNHAM. Per altri emosporidi dei mammiferi poi lo sviluppo, che si inizia ugualmente nelle cellule epiteliali del fegato, avviene con formazioni di grosse merocisti che dànno origine a un'enorme quantità di merozoiti che entrano nei globuli rossi trasformandosi in gametociti, senza dare schizogonie endoeritrocitiche (*Haepatocystis kochi* delle scimmie e *Haepatocystis* dei pipistrelli). In altri plasmodi lo sviluppo avviene solo nelle cellule ematopoietiche (specialmente eritroblasti basofili e serie rossa fino allo emocitoblasto); esempio: il *P. elongatum* degli uccelli. L'esistenza di questi diversi cicli nei differenti plasmodi ha avuto come conseguenza lo svolgersi di numerose ricerche sul loro significato biologico, sulla loro persistenza durante l'infezione, sulla possibilità di produrli con forme endoeritrocitiche anzichè con sporozoiti, sui loro rapporti con le recidive e con l'azione dei medicamenti, sulla patologia comparata delle infezioni da diversi plasmodi in rapporto con i cicli esistenti in ciascuno di essi, sull'immunologia comparata delle diverse infezioni da plasmodi. Si è così prodotto il più bel capitolo della protozoologia moderna, che ha condotto a una serie di acquisizioni scientifiche di estrema importanza per opera, oltre che degli autori sopra citati, di HUFF, BRUMPT, HAWKING, COATNEY, REICHENOW, RODHAIN, GALLIARD, BISHOP, YOUNG, e dello scrivente con i suoi collaboratori. Ma tutti noi che abbiamo vissuto giorno per giorno lo sviluppo, a volte drammatico di queste ricerche, volgen-

doci indietro dobbiamo riconoscere che il punto di partenza è costituito da quelle parole di Grassi: « Deve avvenire una generazione con caratteri particolari ».

* * *

Un altro punto in cui Grassi ha antiveduto gli sviluppi odierni è costituito dai rapporti tra terapia medicamentosa e sviluppo dell'immunità nelle infezioni da plasmodi. Nel 1920 egli a proposito della cura dei malarici scriveva: « L'esperienza mi farebbe ritenere che in generale — parlo perciò in termini relativi ben sapendo che in medicina non c'è niente di assoluto e regole senza eccezioni non esistono — i casi di malaria, che più recidivano, a distanze maggiori o minori, sono compresi tra quelli che al primo accesso di recidiva, vengono curati bene, prolungando la somministrazione di chinino per molti giorni. Ho avuto campo di osservare molti di questi casi e posso dire che mi ha sorpreso il rilevare costantemente un'insistenza nelle recidive, molto più grande di quella che si osserva nei malarici che hanno trascurata la cura e perciò sono diventati più o meno cronici. A me è sembrato che il ripetersi degli accessi febbrili senza che intervenga il chinino provochi nell'organismo una reazione (tentativo di immunizzazione) contro i parassiti, reazione che poi, quando si prende il chinino, ne rinforza per così dire l'efficacia. Sia questa, sia un'altra la spiegazione che si vuol dare al fenomeno, esso si è verificato in molti casi da me seguiti. Ma non per questo lascerei che le febbri si succedessero senza insistere nella cura col chinino, perchè anche tacendo di quelli che non recidivano, alla fine dei conti un accesso febbrile a uno, due o più mesi di distanza, come accade appunto quando la cura si fa prontamente e si prolunga, danneggia l'organismo molto meno di una serie di accessi immediatamente succedentisi ».

Dopo l'introduzione della malarioterapia nella cura della paralisi progressiva le osservazioni che Grassi aveva fatte curando i malarici a Fiumicino vengono ripetute su larga scala e in tutto il mondo. Ma si arriva stranamente a una conclusione che, almeno per la terzana benigna, discorda da quella di Grassi. Infatti la Commissione per la Malaria della Lega delle Nazioni nel suo III rapporto generale sulla terapia della malaria (1932) dichiarava che « les individus qui ont eu une dizaine, ou plus d'accès graves de tierce bénigne, sans qu'on leur ait administré de la quinine, ont déjà acquis une résistence naturelle si grande que quelques faibles doses de ce médicament suffisent pour amener la guérison temporaire. Le quinine ne produit pas d'effet appréciable si elle est administrée pendant la période d'incubation et elle n'a que peu d'action si elle est donnée le premier ou même le deuxième jour de la fièvre initiale. Ce remède est beaucoup plus efficace après plusieurs paroxysmes fébriles qu'à un stade précoce, et son efficacité atteint son maximum lorsque la fièvre et les parasites commencent à diminuer, à la suite de la réaction naturelle de l'organisme. Le frequence et la gravité des rechûtes dépendent principalement du pouvoir de résistence que l'individu infecté possède naturellement, ou a acquis

à la suite d'accès précédents. Toute méthode scientifique tendant à prévoir les rechûtes doit être fondée sur cette connaissance, de façon à permettre aux individus infectés d'acquerir un pouvoir de résistence aussi élevé que possible ».

Tali parole scritte da una Commissione di eminenti scienziati erano molto gravi, e tutto l'indirizzo scientifico della terapia della malaria poteva esserne scosso. Occorreva verificare con l'esperimento se veramente le conclusioni della Commissione erano attendibili. E l'esperimento dà ragione a Grassi. Ricerche dello scrivente mettono in evidenza che è, sì, vero che trattando col medicamento specifico l'attacco primario al suo inizio si producono recidive più frequenti e si prolunga il tempo occorrente per il compimento del processo di immunizzazione, ma d'altra parte il processo immunitario si consegue con un minor numero totale di accessi febbrili. Trattando invece l'attacco primario solo dopo dieci accessi febbrili, si accelera il processo di immunizzazione cosicchè si evitano le ricorrenze, ma si produce un maggior numero complessivo di accessi febbrili. Trattando l'attacco primario dopo cinque accessi, si hanno accessi in numero superiore che col primo metodo e non si ottiene un'immunizzazione rapida come col secondo metodo. Il vantaggio di subire un numero totale di accessi minore possibile essendo per il malato indubbiamente superiore al vantaggio di accelerare il processo immunitario, si conclude che da un punto di vista strettamente scientifico, l'attacco primario di terzana benigna deve essere curato quanto più precocemente possibile.

L'esperimento dimostra che la retta via terapeutica era quella suggerita da Grassi e ben presto le conclusioni della Commissione vengono abbandonate.

* * *

Dell'opera di Grassi sugli anofeli e sulla loro biologia parlerà la prof. La Face. Io mi limiterò a ricordare brevemente l'opera di Grassi e i suoi odierni sviluppi nella parte più prettamente epidemiologica, e cioè sul problema dell'anofelismo senza malaria e della regressione spontanea della malaria nelle zone bonificate.

Anche qui Grassi vede la via giusta fin dall'inizio. L'anofelismo senza malaria può essere un'obiezione grave alla sua teoria che gli anofeli e soltanto gli anofeli trasmettano la malaria. Egli non sottovaluta l'obiezione, ma si pone allo studio. Nella seconda edizione degli « Studi di uno zoologo sulla malaria » (1901) egli riferisce di aver riscontrato alle sorgenti del Serino e in altre località numerosi *Anopheles maculipennis* senza che si verificasse malaria. Ma riferisce anche di aver visto che questi anofeli stanno nelle stalle e pungono buoi, cavalli e maiali, e solo raramente pungono l'uomo.

Ecco però che a Massarosa in Toscana le risaie non sono affatto malarigene benchè vi abbondino gli anofeli (*A. maculipennis, A. pseudopictus*) e questi pungono l'uomo. E inoltre gli *A. maculipennis* di Massarosa fatti pungere su malarici si infettano regolarmente.

Grassi per 15 anni non si occupa più di malaria, ma quando riprende, ritorna di nuovo sul problema coadiuvato dal tecnico Neri. Agli Orti di Schito riscontra che gli *A. maculipennis* non pungono mai l'uomo. Torna a Massarosa e qui gli *A. maculipennis* lo pungono. Però mentre a Schito il ritorno di malarici dalle zone di guerra non ha prodotto alcuna variazione, a Massarosa il ritorno di malarici ha prodotto casi nuovi autoctoni della malattia. Infine Grassi osserva che anche a Massarosa, nei luoghi dove ci sono molti animali, gli uomini non vengono punti. Grassi, pur non risolvendo totalmente il problema dell'anofelismo senza malaria, pone alcune basi della soluzione quando mette in relazione tra loro: 1° l'esistenza di razze biologiche di *A. maculipennis* più o meno tendenti a pungere l'uomo; 2° l'esistenza di condizioni ambientali (agricoltura progredita, molto bestiame nelle stalle) sfavorevoli all'insorgenza della malaria.

Il problema doveva venir risolto più tardi con la scoperta della non omogeneità della specie *A. maculipennis*. Gli studi di Falleroni, di Missiroli, Martini e Hackett della La Face e di altri hanno posto in evidenza l'esistenza di diverse varietà riconoscibili dalle uova. Successive ricerche genetiche dello scrivente, di Swellengrebel e collaboratori, di Bates e di Frizzi hanno dimostrato trattarsi di vera diversità di specie. Agli Orti di Schito è presente l'*A. maculipennis* tipico, esclusivamente zoofilo, a Massarosa vive invece l'*A. messeae*, che, pur essendo prevalentemente zoofilo, può pungere l'uomo, ma in così scarsa misura che l'endemia non sussiste, benchè l'introduzione improvvisa di un certo numero di gametiferi possa dar luogo a una più o mena estesa produzione di nuovi casi, con tendenza però della nuova endemia ad estinguersi spontaneamente Nelle zone intensamente malariche sono invece presenti altre specie, come l'*A. labranchiae* e l'*A. sacharovi*, che dimostrano notevole tendenza a pungere l'uomo. Lo sviluppo dell'agricoltura e la bonifica dei terreni rende sfavorevole l'ambiente allo sviluppo delle specie malarigene, che vengono così sostituite dalle specie innocue, con conseguente origine di anofelismo senza malaria.

Sarebbe troppo lungo solo enumerare i contributi scientifici minori apportati da Grassi alla malariologia. Tutti gli specialisti protozoologi, entomologi, patologi, epidemiologi, ingegneri, agrari che in quest'ultimo cinquantennio si sono occupati di malaria, han dovuto con meraviglia constatare che questo scienziato non solo aveva iniziato lo studio di quasi tutti i problemi malariologici che egli antivedeva si sarebbero sviluppati nel futuro, ma era riuscito a porre le basi sperimentali di gran parte di essi.

L'OPERA ELMINTOLOGICA DI BATTISTA GRASSI

E. Biocca (*)

La grandiosità dell'opera scientifica del Grassi è stata rievocata e illustrata dal Silvestri (**) in occasione delle onoranze per il 70° anno del Grassi e dal Cotronei (***) recentemente ai Lincei, per il centenario della nascita del Maestro, in quella forma che ha reso possibile il fatto di essere stati entrambi allievi diretti del Grassi ed entrambi aver raggiunto il più alto livello scientifico.

Uno dei capitoli dell'attività del Grassi è stato dedicato all'elmintologia medica ed anche in questo campo tale è la molteplicità ed importanza delle sue scoperte che riesce difficile poterne dare in forma succinta una illustrazione sufficiente che non sia una ripetizione di quanto è stato già scritto.

Egli fu sopratutto un biologo e chi risolve importanti problemi biologici viene facilmente dimenticato a differenza di chi lascia il proprio nome legato alla descrizione di nuove specie. Penso quindi che la maniera migliore di ricordare il Maestro sia di indicare e documentare in forma schematica, per quanto è possibile con le sue stesse parole, le scoperte e i contributi assolutamente nuovi portati dal Grassi alla nostra Scienza, anche se la trattazione ne deriverà arida e pesante.

I cicli di vita dei vermi parassiti rappresentano uno dei capitoli più interessanti della biologia e sono stati tra i più difficili ad essere risolti. Basti semplicemente considerare che da quando il Redi intuì che le vesciche o cisti idatidee erano la forma larvale di vermi intestinali, al giorno in cui Siebold riuscì con esse a riprodurre nel cane l'*Echinococcus granulosus*, passarono circa due secoli durante i quali sommi elmintologi quali Goeze, Rudolphi ecc. avevano studiato l'argomento.

Quando il giovane Grassi, ancora studente di medicina, iniziò le sue ricerche di parassitologia, la maggior parte dei problemi biologici, legati ai cicli di vita degli elminti dell'uomo era ancora sconosciuta: egli riuscì, l'uno dopo l'altro, a penetrare quasi tutti i segreti.

Nematodi dell'uomo

Non era stato ancora iniziato lo scavo della galleria del Gottardo e le notizie sull'anchilostoma e sulla malattia da esso prodotta erano vaghe e contradittorie. Il Sonsino, grande elmintologo italiano il cui nome viene purtroppo ricordato raramente, aveva in Egitto sospettato che il verme, scoperto dal

(*) *Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma* - (Direttore: E. Biocca).

(**) Silvestri F. Discorso nelle «Onoranze a Battista Grassi». Roma tip. Senato 1925.

(***) Cotronei G. - Battista Grassi - Quaderno 33, Acc. Naz. Lincei Probl. att. Sc. e Cult. 10 aprile 1954.

Dubini a Milano, potesse essere causa di malattia, ma non si ammetteva che in Italia e in Europa esistesse uno forma morbosa dovuta a questo parassita. Il Grassi faceva allora il quinto anno di medicina e a Rovellasca osservò una moria di gatti. Li esaminò minutamente e nel loro intestino tenue scoprì dei vermi molto simili all'*Ancylostoma duodenale* dell'uomo. Per primo si rese conto che quei vermi succhiavano sangue, provocando una grave enterite e una gravissima anemia e riconobbe in essi la causa della epizoozia. In collaborazione con C. Parona, assistente di L. Maggi, descrisse molto succintamente, senza dare misurazioni, il parassita del gatto, che venne da essi considerato una nuova specie e chiamato *Dochmius Balsami* in onore del Prof. G. Balsami Crivelli, da cui Grassi era stato «iniziato nell'arte dell'osservare», come ebbe ad esprimersi L. Maggi, presso il quale Grassi lavorava (L. Maggi, Gli studi di C. Parona e B. Grassi intorno all'anchilostoma duodenale. R. Ist. Lomb. Ss. e Lett. 23 maggio 1878).

I successivi parassitologi non hanno accettato la validità di questa specie, considerandola sinonimo dell'*Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859). Noi ci siamo occupati a lungo di questo argomento e possiamo affermare che l'anchilostoma del gatto è certamente una specie distinta dall'*A. caninum*. Se gli autori che in anni molto più recenti hanno ripreso questi studi, avessero dato maggior peso alle ricerche a cui era legato il nome del giovane Grassi, avrebbero evitato di pubblicare che l'*Ancylostoma caninum* isolato dal cane, non infesta il gatto e viceversa. Non si tratta infatti di uno strano comportamento biologico, ma di due specie diverse.

Forte di questa prima scoperta il Grassi ebbe la persuasione che anche nell'uomo gli anchilostomi potessero dare una grave malattia con anemia. Leuckart citato dal Grassi e da Parona, scriveva nel 1876, che nel tenue dell'uomo, accanto ad anchilostomi adulti, si trovano anche uova in via di segmentazione, ma che si ignora il destino di queste uova e la maniera con cui avviene l'infestazione umana. Il Grassi, con il Parona, per primo descrisse minutamente le uova nelle feci e per primo riuscì a fare la diagnosi di anchilostomiasi nell'ammalato. «La diagnosi dell'anchilostoma è facilissima — essi scrivono — a raggiungere prontamente tale meta basta osservare ad un ingrandimento microscopico almeno di 90 diametri un pò di feci o di vomito diluito con un menstruo qualunque. Se la materia è recente troveremo appena le uova di anchilostoma in segmentazione: se è stantia anche gli embrioni e le larve». (47)

Nel 1879 Grassi e Parona E. stabiliscono che nell'anchilostomiasi ha grande importanza il numero di parassiti che si trovano nell'intestino e che è possibile conoscere approssimativamente il numero di parassiti presenti, in base al numero di uova, che si trovano in circa un centigrammo di feci. Essi affermano inoltre: «molteplici osservazioni ci autorizzano a stabilire che per produrre una grave anemia in individuo sano e robusto ne siano necessari

almeno 500... L'anchilostoma si nutre sempre di sangue anche in Italia, e non esiste differenza di costumi tra gli anchilostomi italiani ed egiziani, come pensa SANGALLI e se in Italia, relativamente fanno meno danno, gli è perchè sono meno numerosi che in Egitto. (Lo che dipende sopratutto dalle condizioni del clima e del suolo)„„ Mille anchilostomi in un italiano producono un'anemia mortale come altrettanti in un egiziano; dieci come in un italiano, così in un egiziano non fanno danni sensibili». (48)

Per dimostrare che l'anchilostoma è ematofago il GRASSI «ha collocato un vivace anchilostoma nello spazio labiogengivale inferiore della sua bocca: dopo pochi minuti i dottori PARONA e BOSSI verificarono che nel punto in cui stava attaccato era comparsa una macchiolina rossa». (48)

Un grande problema biologico però doveva esser risolto. Possono gli anchilostomi moltiplicarsi direttamente nel corpo umano o è necessario un ciclo nel mondo esterno o in qualche ospite intermedio?

Il GRASSI non esitò a sottoporre sè stesso ai più duri esperimenti. «Non vogliamo tacere che uno di noi (il GRASSI) ha trangugiato una grossa pillola carica di uova di anchilostoma in via di segmentazione. Sono ormai quarantacinque giorni e non si manifestò per anco sintomo alcuno riferibile alle presenza di questo parassita, nè si trovarono le uova nelle sue feci». (47) Nel successivo lavoro dell'anno 1879 (48) si legge: «Il GRASSI ne ha mangiato molte (uova) e non gli si sviluppò l'anchilostoma. Resta perciò provato che non può svilupparsi nell'uomo a mezzo delle uova in segmentazione (2,4,6 cellule) e quindi non può neppure in esso moltiplicarsi».

E' necessario quindi ammettere che esiste un ciclo di sviluppo. «Tenendo il vasetto in un taschino del panciotto, già otto ore dopo che la fece veniva emessa, comparivano gli embrioni nelle uova e già dopo due giorni le avevano abbandonate». (48) Il GRASSI e PARONA seguono lo sviluppo delle larve nelle successive mute e arrivano a questa conclusione: «le uova si sviluppano in larve nella feccia o (trasportate via da essa per mezzo delle acque) nel fango e nei terreni irrigati. Quindi le larve possono pervenire nel corpo umano o *direttamente* mangiando verdure poco o punto cotte o toccandosi la bocca con le mani imbrattate di fango, come può accadere di leggieri nei fornaciai, nei fanciulli ecc. o *indirettamente* per mezzo dell'acqua potabile trascorsa di recente sopra fecci, sopra fango, sopra erbaggi che ospitano larve». (48)

Restava solo al LOOSS, in anni successivi, di poter aggiungere che oltre alle vie indicate dal GRASSI e dal PARONA, esisteva la via cutanea attraverso cui le larve di anchilostoma possono penetrare nell'organismo. Anche la terapia fu indicata dal GRASSI e dal PARONA E., i quali segnalarono il chenopodio, sul quale si ripromettevano di eseguire esperienze.

L'anchilostomiasi è una delle grandi malattie che affliggono diecine di milioni di uomini, sopratutto nei climi tropicali e subtropicali. E' con giusto orgoglio nazionale che noi possiamo considerare che se la lotta è possibile e

se la malattia retrocede di fronte alle grandi campagne sanitarie, il merito spetta sopratutto ai grandi biologi italiani, precisamente al DUBINI che scoprì il parassita, al GRASSI e ai suoi collaboratori che ne svelarono quasi tutti i problemi del complesso ciclo di vita, e al PERRONCITO e al BOZZOLO che durante la grande epidemia del Gottardo studiarono la terapia e la epidemiologia della malattia. Il GRASSI, senza dubbio, occupa il primo posto nella riconoscenza dei posteri.

* * *

Nel 1876 un nuovo problema di elmintologia sorge all'orizzonte. Il francese NORMAND, medico militare a Tolone scopre nelle feci e nelle autopsie di reduci dalla Cocincina dei piccolissimi nematodi che vengono studiati dal BAVAY. I parassiti trovati nelle feci, dopo qualche tempo dall'emissione e quelli rinvenuti direttamente nell'intestino sono chiaramente diversi e il BAVAY crea due nuove specie del genere *Anguillula*, l'*A. stercoralis* e l'*A. intestinalis;* la prima caratterizzata dal possedere un faringe di tipo rabditoide, come i parassiti del genere *Rhabditis*, trovati comunemente nel terreno, la seconda dall'aver invece un esofago del tipo strongiloide. Il giovanissimo GRASSI, nell'anno successivo, inizia lo studio anche tra noi e nel 1878 rende noti i risultati delle ricerche eseguite a Pavia e a Rovellasca. Il parassita esiste in Italia non solo nell'uomo, ma anche in molte specie animali. GRASSI descrive l'anguillula del coniglio e osserva il nematode nella donnola e nel maiale. Una osservazione lo sorprende: la mancanza di maschi nell'intestino o nelle feci degli animali parassitati. Studia il parassita del coniglio e viene indotto ad ammetter la dimorfobiosi di esso. Egli si rende rapidamente conto che il parassita non appartiene al genere *Anguillula* e il nuovo genere *Strongyloides* Grassi 1879, è legato al suo nome.

I maggiori elmintologi e biologi dell'epoca, dai PARONA, a PERRONCITO, GOLGI, MONTI ecc. iniziarono anch'essi ricerche sul nuovo parassita e GRASSI si associò, come aveva fatto per l'anchilostoma, con i PARONA. Essi fecero prove di culture e di infestazioni sperimentali e dimostrarono che la malattia può essere presa direttamente per via digerente. Il GRASSI fece inoltre notare che non si trovano mai le uova di anguillule nelle feci, opponendosi in ciò all'opinione del PERRONCITO e del LEUCKART.

Tra i vari ricercatori sorsero però rapidamente discussioni e violente polemiche. Nel 1883 GRASSI, il cui carattere aspro e battagliero prendeva a volte il sopravvento sulla dolcezza e serenità del suo animo, ruppe i rapporti di collaborazione con i PARONA e iniziò una vivacissima polemica con PERRONCITO. (11) «Il punto più contrastato — scrive il GRASSI — è questo: se le larve da me scoperte nelle feccie recenti, larve, che sono state ridescritte dal PERRONCITO (al solito, senza debitamente citarmi) appartengono all'anguillula intestinale ovvero all'anguillula stercorale. Io ho dimostrato in mille modi che esse derivano dalla

anguillula intestinale, e conchiusi che l'anguillula stercorale non è un vero parassita dell'uomo, ma la seconda forma (libera) dell'anguillula intestinale ». Questa grande scoperta, il cui merito viene da alcuni contestato al Grassi, fu comunicata il 20 dicembre 1882 all'Accademia di Wurzburg.

Veniva così scoperto un ciclo di vita finora sconosciuto, in cui si aveva oltre alla fase parassita anche una fase libera che, a differenza di ciò che avviene con l'anchilostoma, raggiungeva la maturità sessuale e si riproduceva nel mondo esterno.

« Il Leuckart pensa — dice il Grassi — che l'uomo si infesti mangiando larve figlie di anguillula stercorale. Io credo che ciò non sia necessario, ma che le larve eliminate con le feccie, quando sono diventate, come io ho dimostrato per primo, filariformi e forse prima ancora, se vengano inghiottite, possono direttamente trasformarsi in anguillule intestinali ». (11)

Il Grassi quindi non solo aveva visto l'alternanza di una forma parassita e di una forma libera, ma aveva anche riconosciuto che sono infestanti le larve filariformi o strongiloidi e non le rabditoidi.

Da quando Grassi ha cessato di occuparsi di questo parassita poco di nuovo è stato detto che interessi veramente la scienza. Recentissime ricerche di genetica starebbero ad indicare che l'alternanza delle generazioni e la comparsa di larve strongiloidi infestanti sarebbero in rapporto con una diversa configurazione cromosomica. Le varie ipotesi circa la femmina parassita di cui il Grassi non aveva potuto trovare i maschi, e dai più considerata partonogetica, sono ancora in piena discussione. Alcuni autori negano la partenogenesi ed ammettono che si tratti invece di individui ermafroditi, altri pensano addirittura che la femmina parassita venga fecondata durante il passaggio per i polmoni, prima di raggiungere l'intestino, da maschi non parassiti, rapidamente eliminati dall'organismo. Questi problemi sono gli unici che non furono affrontati dal Grassi e dopo circa 80 anni non sono stati ancora definitivamente risolti.

* * *

Pur di giungere a un risultato scientifico nessun esperimento, anche il più ripugnante preoccupa il Grassi. Per dimostrare infatti che l'opinione dei grandi elmintologi Leuckart, Cobbold, Davaine ecc. sulla presunta azione patogena dell'ascaride del gatto era errata, egli ingoiò due ascaridi del gatto molto mobili. Non avendo trovato nelle sue feci uova, ripetè l'esperimento ingoiando quattro nuovi ascaridi, che ritrovò morti dopo alcuni giorni nelle sue feci. Da tali prove concluse che l'ascaride del gatto non trova nell'intestino umano un ambiente che gli permetta di riprodursi e di sopravvivere.

Non era ancora noto a quell'epoca il ciclo di sviluppo dell'ascaride umano. Le ricerche sugli anchilostomi e sulle anguillule avevano mostrato la possibilità di un ciclo di vita o di parte del ciclo di vita libero nel mondo esterno.

Per analogia con quanto si sapeva per i cestodi, molti elmintologi, tra cui il LEUCKART, pensavano che esistesse per gli ascaridi umani un ospite intermedio. Il GRASSI iniziò le sue ricerche senza lasciarsi influenzare da teorie o da analogie e per primo, su sè stesso, nel 1881 portò a termine la ricerca che lo persuase che l'*Ascaris lumbricoides* dell'uomo non ha bisogno di compiere parte del ciclo nel mondo esterno o in ospite intermedio, ma che le uova del verme, una volta mature, ingoiate dall'uomo, si sviluppano direttamente. Le esperienze eseguite in seguito non fecero che confermare la prima sperienza. Un suo allievo che inghiottì uova embrionate, ritrovò dopo circa un mese uova immature nelle proprie feci, esattamente come il GRASSI aveva provato in sè stesso. Anche un ragazzo di 7 anni, a cui erano state somministrate uova embrionate eliminò, dopo alcuni mesi in seguito ad un antielmintico, ben 143 ascaridi. Infine il GRASSI accerta che le uova per essere infestanti, debbono aver raggiunto un determinato grado di maturazione che si rivela con la perdita dell'involucro albuminoso.

* * *

Sempre il GRASSI svela il ciclo di vita del tricocefalo. Questa volta si associa al suo nome quello di un suo allievo siciliano, il CALANDRUCCIO. Ci limitiamo a citare ciò che il BRUMPT (Précis de Parasitologie - Paris, Masson 1949) nel suo classico trattato espone a proposito dell'evoluzione del tricocefalo. « L'homme s'infeste en avalant des oeufs embryonnés, le développement est donc direct. La démonstration en a été faite par GRASSI et S. CALANDRUCCIO: ce dernier auteur examine ses matières fécales pendant six semaines et s'assure qu'il n'héberge aucun tricocéphale. Le 27 juin, il avale un certain nombre d'oeufs embryonnés, et le 24 juillet, il constate déjà dans ses selles des oeufs caractéristiques. Une expérience faite sur une autre personne fut également positive. L'évolution du parasite est donc très rapide, le point est intéressant à connaître, car il peut expliquer une infestation simultanés et tout à fait indépendante de l'homme par le bacille d'Eberth et par les tricocéphales à la même source polluée ».

* * *

Ancora esisteva un ultimo nematode patogeno per l'uomo e diffuso in Europa, precisamente l'*Enterobius vermicularis* o ossiuro, il cui ciclo non era ben noto. Anche a questa scoperta è legato il nome di GRASSI. « Les expériences des LEUCKART (1865), GRASSI (1879), de CALANDRUCCIO (1888) ont démontré que ce ver évolue directement et que l'infection se fait par l'ingestion d'oeufs embryonnés ». (BRUMPTI).

* * *

Verso il 1877 il grande elmintologo inglese MANSON aveva fatto una scoperta estremamente interessante. La filaria che provoca le note elefantiasi dei paesi tropicali e che oggi chiamano *Wuchereria bancrofti* viene trasmessa da

una zanzara. Questa scoperta confermò l'importanza degli artropodi nella trasmissione delle malattie parassitarie ed ebbe senza dubbio grande influenza su tutta l'opera successiva del GRASSI. Sebbene la elefantiasi da filaria non esistesse in Italia, egli raccolse tutti i casi di filariosi descritti in Italia e disponendo però solo di esemplari femmine trovati in cisti palpebrali, o sotto la pelle ecc. descrisse il verme col nome di *Filaria inermis*. Infelicemente, per la mancanza di maschi, la specie è considerata da alcuni *species inquirenda*, da altri sinonimo della *Filaria conjunctivae* Addario, 1885. Nel 1950 venne in Italia da Londra il noto elmintologo inglese LE ROUX, per studiare le filarie di GRASSI, ma infelicemente non ci fu possibile trovare nessun esemplare conservato nè a Roma, nè a Napoli presso la collezione elmintologica di MONTICELLI e quindi stabilire se si trattasse realmente di una specie nuova. Riferiscono coloro che hanno avuto il GRASSI come diretto maestro che nella sua mente geniale e vulcanica non esisteva posto per le collezioni e per... l'ordine. Così pure non ci fu possibile ritrovare e studiare l'altra filaria descritta dal GRASSI come parassita del cane, la *Filaria recondita* di cui egli studiò il ciclo di sviluppo con CALANDRUCCIO.

E' merito del GRASSI nello studio degli *Spirurata* di avere, in collaborazione con NOÉ, studiato accuratamente la maniera con cui le microfilarie vengono inoculate al cane dalle zanzare e osservato in prove sperimentali che la *Spirocerca sanguinolenta* del cane ha come ospite intermedio un insetto.

CESTODI DELL'UOMO

Nel 1879 il GRASSI osservò nelle feci di una ragazza degli speciali « corpi oviformi », che descrisse e di cui non riuscì a stabilire con esattezza la natura: i corpi oviformi avevano i caratteri delle uova dei cestodi le quali però, con eccezione di quelle del botriocefalo, non si rinvengono abitualmente nelle feci, perchè ai cestodi manca il poro di parto. Dopo alcuni anni, precisamente nel 1886, osservò a Catania le stesse formazioni nelle feci di due giovani catanesi e, persuaso ormai che si trattasse di cestodi, diede un antielmintico e ottenne migliaia di piccolissimi vermi, la tenia nana (*Hymenolepis nana*). Riconobbe nelle uova della tenia nana i corpi oviformi che aveva già visto e per primo diede una descrizione particolareggiata delle uova e della malattia. Egli affermò che la tenia nana, a differenza degli altri cestodi dà « una malattia diagnosticabile facilmente all'esame microscopico delle feccie e prontamente curabile col felce maschio ». (16). Nello stesso lavoro accennò al ciclo di vita del parassita ed affermò di avere « forti ragioni per sospettare che il cisticercoide della larva del *Tenebrio molitor* (verme della farina) appartenga al ciclo della tenia nana, e che perciò l'uomo si infetti di questa tenia inghiottendo inavvertitamente le larve in discorso ».

Questa ipotesi però non lo convinse completamente sopratutto perchè

l'enorme numero di vermi che si possono ritrovare nell'intestino umano presupporrebbe l'ingestione di un gran numero di larve di *Tenebrio molitor,* cosa certamente molto difficile. Il problema lo appassionò fortemente perchè, come egli afferma, la tenia nana, «qui a Catania, si trova nell'otto per cento circa degli individui di basso ceto, anzi alcuni ne presentano migliaia e migliaia» (21). Per circa un anno tentò di scoprire in quale maniera l'uomo si infesti e quale possa essere l'ospite intermedio esaminando insetti, molluschi ecc. e ripetendo senza risultati gli esperimenti sui volontari.

«Una sola volta, egli afferma, io trovai in una larva di *Tenebrio molitor* due cisticercoidi che avevano la testa uguale a quella della tenia nana, li diedi a mangiare a un volontario, ma non si svilupparono». Insieme al suo allievo Calandruccio pensò ad una infestazione diretta. «Fummo perciò costretti a ricorrere ad alcuni volontari, i quali inghiottirono feccie con uova di tenia nana; purtroppo però anche questi esperimenti riuscirono infruttuosi». (21).

Finalmente trovò nei ratti di chiavica (*Mus decumanus*) un'altra *Hymenolepis,* la «tenia murina» (o *Hymenolepis fraterna*) del tutto simile alla tenia nana. Tutti i ratti catturati nel macello di Catania erano parassitati da un gran numero di questi cestodi, mentre nessun insetto, nessun miriapode, nessun mollusco catturato nella stessa zona aveva cisticercoidi.

In seguito ad una perfetta esperienza su ratti albini di laboratorio, sicuramente liberi da cestodi, a cui fece ingerire circa 10 proglottidi gravide di tenia murina, ottenne l'infestazione diretta e massiva degli animali da esperimento.

Esaminando con gran cura le pareti dell'ileo di uno di questi ratti egli osservò piccole cisti contenenti ognuna una tenia murina in via di sviluppo, alcune con gli uncini del rostello ancora piccolissimi, altre più giovani, in cui erano presenti ancora gli uncini dell'oncosfera.

Il Grassi si rese conto dell'importanza della scoperta e scrisse: «Il fatto è strano, ha dell'incredibile, lo concedo facilmente, ma è un fatto e ad esso dobbiamo inchinarci. Il concetto del ciclo evolutivo dei cestodi deve naturalmente venir riformato, per metterlo in armonia con i fatti».(21).

L'imenolepiasi è una malattia che oggi sappiamo molto diffusa nel mondo, in tutti i continenti. In alcuni stati dell'America del Nord, come per esempio in Florida, essa rappresenta un grave problema sanitario. Noi possiamo affermare che questa malattia è stata scoperta dal Grassi, dal Grassi sono state identificate e descritte le uova e dal Grassi è stato scoperto il ciclo di vita. L'*Hymenolepis* infatti ha un ciclo con un solo ospite nel quale si hanno le forme larvali e le forme adulte e questo ciclo è stato svelato in tutti i particolari dal Grassi con l'*Hymenolepis fraterna* e confermato in seguito con esperimenti sull'uomo con l'*Hymenolepis nana* dal Calandruccio e da altri. Sappiamo oggi, in seguito alle ricerche sopratutto di Bacigalupo del 1927 e 1928 (*Hymenolepis nana.* C. R. Congr. Int. Med. hôp. et hyg. Cairo - 1928), confer-

mate dal Brumpt, che l'*Hymenolepis nana* può avere anche un ciclo con un ospite intermedio invertebrato e le esperienze sul *Tenebrio molitor* hanno dimostrato la possibilità di ottenere cisticercoidi di *H. nana* in questo artropode. Anche il merito primo di questa scoperta risale al Grassi che aveva già fatto la osservazione, dichiarando che i cisticercoidi trovati nel *Tenebrio* avevano la testa uguale a quella della tenia nana.

Con le ricerche sull'*Hymenolepis* Grassi ha aperto un nuovo campo di studio ancora fecondo, poichè tutte le volte che noi troviamo migliaia di cestodi nell'intestino di un animale noi dobbiamo pensare alla possibilità di un ciclo di vita senza ospite intermedio.

Le iperparassitosi intestinali da cestodi sono abbastanza frequenti. A scopo di curiosità ricorderemo che in una beccaccia abbiamo trovato una parassitosi da *Hymenolepis sp.* e abbiamo, col metodo della diluizione, contato dai 350 ai 400.000 scolici. Questa iperparassitosi è relativamente frequente tra le beccaccie il cui intestino è ricercato dai buongustai per fare crostini; il sapore eccezionalmente appetitoso di questi crostini è forse legato a questi piccolissimi cestodi. In uno struzzo abbiamo raccolto due chili di cestodi ecc.; in tutti questi casi certamente i parassiti si sono moltiplicati nell'intestino stesso, senza bisogno di un ospite intermedio, come per primo il Grassi ci ha dimostrato.

* * *

Quando si trovava a Catania, l'attenzione del Grassi fu attirata dal fatto che un altro cestode, la tenia cocumerina o *Dypilidium caninum* era enormemente diffusa tra i cani; qualche caso di parassitosi veniva osservato anche tra gli uomini, sopratutto tra i bambini. Nessun cisticerco di questo cestode o altra forma larvale era però stata trovata nei vertebrati e riusciva difficile immaginare come i cani potessero infestarsi con tanta facilità. Con quella sicurezza che non lo aveva mai indotto in errori il Grassi trovò un cisticercoide nella pulce del cane e riconobbe che si trattava della forma larvale del *Dypilidium*, che, in successivi lavori, eseguiti anche con la collaborazione di Rovelli descrisse minutamente. In una sola pulce trovò fino a 50 forme larvali con scolice identico a quello del *Dypilidium*. Potè poi stabilire che per poter provocare con facilità l'infestazione sperimentale era necessario che la pulce fosse inghiottita un pò schiacciata e che specie diverse di pulci possono servire da ospite intermedio, compresa la pulce dell'uomo.

Acantocefali

Ancora un'altra grande scoperta nel ciclo di vita degli elminti fu fatta dal Grassi in collaborazione con Calandruccio. Essi osservarono che in Sicilia eran particolarmente frequenti gli acantocefali del maiale, che ritrovavano in

circa il 40% degli animali esaminati. Così trovarono acantocefali del genere *Echynorynchus,* genere che oggi si preferisce chiamare *Moniliformis,* sia nei cani, che nei ratti (*Mus decumanus*). Studiarono il ciclo di vita degli acantocefali dei ratti e poterono dimostrare che la forma larvale si ritrovava in specie del genere *Blaps,* le quali potevano ospitare fino a 100 forme larvali in ogni singolo individuo. Divorando le *Blaps,* i ratti si infestano. Nella stessa maniera, il Calandruccio, sperimentando su sè stesso, si infestò con l'acantocefalo del ratto e dimostrò quindi che la parassitosi può colpire incidentalmente anche l'uomo.

Veniva così brillantemente dimostrato anche il ciclo di sviluppo di una specie appartenente a un gruppo di elminti quali gli acantocefali a quell'epoca ancora scarsamente conosciuto.

* * *

Grassi ha portato un contributo chiarificatore e ha indicato le vie da seguire anche nei campi dell'elmintologia che ha appena sfiorato. Lo studio eseguito col Rovelli (54) sullo sviluppo del cisticerco e del cisticercoide pose chiaramente in luce il complesso sviluppo delle forme larvali dei cestodi e le somiglianze strette che esistono tra alcune di queste (quale per es. il cisticercoide del *Dypylidium caninum*) e le cercarie dei trematodi, come l'intimo rapporto che lega i cestodi ai trematodi.

Tra i primi il Grassi confermò l'esistenza in Italia della botriocefalosi. In polemica col Parona, il quale sosteneva che esistevano casi di botriocefalosi in individui i quali dichiaravano di non aver mangiato pesci, affermò, basandosi su una acutissima critica, che solo mangiando determinati pesci è possibile infestarsi e che in Sicilia la botriocefalosi manca, principalmente perchè sono eccezionali i pesci che possono trasmetterla. Col Rovelli pubblicò uno studio completo sullo sviluppo del botriocefalo, confermando pienamente le ancora discusse ricerche del Braun.

Segnalò con Calandruccio la grande diffusione dell'echinococcosi nell'uomo e nelle pecore in Sicilia e chiese che il Governo prendesse seriamente a cuore il problema. Osservò col Rovelli la presenza della schistosomiasi animale in Sicilia e comunicò una brevissima nota ai Lincei che merita di essere trascritta integralmente (52) « Noi vogliamo richiamare l'attenzione dei patologi e degli igienisti sul fatto, da noi determinato, che la *Bilharzia crassa* Sons. è comunissima (circa il 75%) nelle pecore che si macellano a Catania e che provengono dalla Piana di Catania, in cui sono nate e cresciute. Questo fatto deve fare una grande sorpresa, perchè finora si era ritenuto che le bilharzie appartenessero esclusivamente all'Africa: esso apre una strada facile a chi ha mezzi di studio, per scoprire il ciclo evolutivo di questo parassita: esso lascia infine adito al sospetto che la Bilharzia dell'uomo possa rendersi ende-

mica anche nei paesi irrigui dell'Italia per mezzo di qualche soldato che ritornasse dall'Africa infetto di questo terribile parassita ».

Dopo oltre 50 anni le segnalazioni del Grassi sono ancora vere e palpitanti. L'Italia è ancora tra le nazioni più colpite dall'echinococcosi e, come il Grassi, speriamo che finalmente il problema venga sentito e affrontato con l'energia che richiedono le conseguenze tragiche della parassitosi sulla salute e sull'economia del Paese.

Le stesse parole del Grassi a proposito del pericolo dell'insediamento della schistosomiasi in Italia furono ripetute dallo Zavattari (Possibilità di acclimatazione della schistosomiasi vescicale in Italia - Atti 19° Congr. Soc. Ital. Med. Int. ott. 1933) e sono purtroppo di sempre maggiore attualità adesso, che sappiamo, perchè abbiamo seguito il consiglio del Grassi, che il *Bulinus contortus* (il quale esiste nella Sicilia, nella Sardegna e in parte del continente italiano) trasmette presso di noi la schistomiasi animale e che Le Roux (comunicazione personale) ha controllato che i *Bulinus* raccolti in Sardegna sono ottimi ospiti intermedi sperimentali anche per lo *S. haematobium* dell'uomo.

Il Grassi è stato, dopo Redi, certamente il più grande parassitologo ed elmintologo italiano. E' sufficiente ricordare che in Europa gli elminti comunemente parassiti dell'uomo sono, tra i nematodi l'*Ancylostoma duodenale*, l'*Ascaris lumbricoides*, l'*Enterobius vermicularis*, lo *Strongyloides stercoralis*, il *Trichuris trichiura*, tra i cestodi il *Dipylidium caninum*, il *Dyphyllobotrium latum*, l'*Echinococcus granulosus*, l'*Hymenolepis nana*, la *Taenia solium* e *saginata* (rarissime le infestazioni da trematodi), per rendersi rapidamente conto di quale sia stato il contributo portato dal Grassi alla elmintologia umana. Con eccezione delle tenie, dell'echinococco e del botriocefalo, il cui ciclo era noto prima che Grassi iniziasse i suoi lavori, quasi tutte le nostre conoscenze sulla biologia degli altri vermi parassiti dell'uomo in Europa sono legate al nome di Grassi e dei suoi collaboratori.

Alla fine della sua lunga e luminosa carriera, Egli ha il solo rimpianto di non essersi dedicato interamente allo studio dei parassiti degli uomini e degli animali. Se avesse seguito l'impulso della sua mente, la sua produzione scientifica, come egli scrive « sarebbe stata cento volte superiore e forse molte scoperte che sono legate a nomi stranieri sarebbero state fatte invece in Italia». Egli, come l'altro grande elmintologo Corrado Parona, era un medico « Medici ambedue — scrisse L. Maggi, loro maestro — anzichè aver con le conoscenze patologiche un elemento nocivo al naturalista, approfittarono della loro cultura per soddisfare, coi loro reperti scientifici, a quell'abitudine che si fa sempre chi frequenta o ha frequentato sale di ammalati, voglio dire trovare la causa della malattia per cercarne i rimedi ». Il Grassi mantenne sempre acceso questo affetto per l'Umanità sofferente e fece scopo fondamentale della sua vita la lotta contro le grandi malattie dell'uomo, dall'anchilostomiasi alla malaria.

Mi ha commosso trovare che il Grassi è stato il primo scienziato che fin dal 1923 ha alzato la sua nobile voce contro i pericoli di una guerra micro-biologica presentando nella seduta del 16 febbraio, una mozione al Senato con la quale «ricorda che vi sono tecnici, ad onore del vero non italiani, i quali stanno studiando il modo di diffondere in guerra i germi di pericolose malattie umane. Si augura che questi studi falliscano; comunque avvisa il Governo a promuovere la stipulazione di una convenzione internazionale per evitare l'impiego in guerra di germi patogeni».

Per Grassi la Scienza ha come fine supremo «il trionfo del vero, del bello e del buono», al suo spirito ripugna pensare che la Scienza possa essere destinata a fini diversi.

Questo concetto è in lui dominante e ritorna nel discorso di prolusione dopo la sua chiamata a Roma come in quello di ringraziamento alle onoranze fattegli in occasione del suo 70° anno e che rappresenta quasi il suo testamento morale. Egli termina il suo dire con questo concetto ottimistico: «Tutte quello che più mi sta a cuore è stato sfiorato, ad eccezione di un punto a toccare il quale sono molto esitante, ma poichè esso sta in cima ai miei pensieri e tutto collega quanto ho fin qui esposto, mi risolvo a non lasciarlo sotto silenzio. Quarant'anni addietro quando tutti credevano che l'ascesa dell'Umanità verso un regno di benessere e di giustizia sociale fosse assicurato, ha fatto profonda impressione nel mondo il pronostico del filosofo darwiniano Spencer «l'età nostra è una di quelle età di decadimento che compiuta la loro evoluzione toccano all'estremo limite della dissoluzione e fecondano della loro putredine la vita nuova di secoli venturi». Poichè purtroppo i segni forieri della eclisse vaticinata erano apparsi sull'orizzonte, nel 1896, in questa aula, riportai le parole del filosofo inglese, aggiungendovi l'insegnamento del nostro Vico, che la storia dell'uomo si distingue dalla storia della natura per essere opera e fattura nostra. Concludevo io allora: se l'uomo è il padrone della sua storia, la catastrofe prevista da Spencer non è necessaria, non è inevitabile...».

La stessa fede nella Scienza e nei destini dell'Umanità avvicina ancor più il Grassi all'altro grande genio benefico latino, il Pasteur, che crede «invincibilmente che la Scienza e la Pace trionferanno sull'ignoranza e sulla guerra e che gli uomini si accorderanno non per distruggersi, ma per edificare».

Non potevano uomini come Grassi e Pasteur pensare diversamente e a noi, oltre alle scoperte scientifiche, essi hanno tramandato anche questa grande eredità morale.

LAVORI DI ELMINTOLOGIA PUBBLICATI DA B. GRASSI

1) 1878 - Intorno ad una nuova malattia del gatto analoga alla clorosi d'Egitto dell'uomo. *Gazz. med. ital. lomb.*, *38*, 451-454.

2) 1878 - L'*Anguillula intestinalis*. Nota preventiva *Gazz. med. ital. lomb.*, *38*, 471-474.

3) 1879 - Contribuzione allo studio dell'elmintologia. I. La tenia mediocanellata e l'igiene. *Gazz. med. ital. lomb.*, *39*, 115-116.

4) 1879 - Contribuzione allo studio dell'elmintologia. II. Botriocefalo lato. III. Semi-zucca. IV. Corpi oviformi. *Gazz. med. ital. lomb.*, *39*, 154-156.

5) 1879 - Contribuzione allo studio dell'elmintologia. V. Intorno all'*Ascaris mystax* *Gazz. med. ital. lomb.*, *39*, 276-278.

6) 1879 - Sopra l'*Anguillula intestinale* (*Rabdonema strongyloides*). *Rend. R. Ist. lomb. di sc. e lett.*, *12*, 228.

7) 1879 - Intorno ad un caso d'anchilostomiasi. *Arch. sc. med. Torino*, *3*, 12 pagine.

8) 1880 - Intorno ad un botriocefalo dell'uomo. *Ann. Univ. med. e chir. di Milano*, *251*, 30-42.

9) 1881 - Note intorno ad alcuni Parassiti dell'uomo *Gazz. degli Ospitali*, Milano, *2*, 433-439.

10) 1882 - Anchilostomi ed Anguillule. *Gazz. degli Ospitali, Milano*, *3*, 325.

11) 1883 - Intorno a una questione parassitologica. Un'ultima parola al Prof. Perroncito (*Anguillula intestinalis*). *Gazz. med. ital. lomb.*, *43*, 260-262.

12) 1883 - Un'ultimissima parola al Prof. Perroncito. *Gazz. med. ital. lomb.*, *43*, 391-393.

13) 1883 - Un'altra nota sulle anguillule e sugli anchilostomi. *Gior. R. Acc. Med. Torino*, *31*, 119-121.

14) 1885 - Contribuzione allo studio della nostra fauna. *Atti Acc. Gioenia*, *18*, 241.

15) 1886 - Cenno preventivo intorno ad una nuova malattia parassitaria dell'uomo. (*Taenia nana*). *Gazz. degli Ospitali*, Milano, 7, 450.

16) 1886 - Ulteriori particolari intorno alla *Taenia nana*. Nota preliminare. *Gazz. degli Ospitali*, Milano, 7, 619-620.

17) 1887 - Die *Taenia nana* und ihre medizinische Bedeutung. *Centralbl. Bakt.*, *1*, 94-100.

18) 1887 - *Tricocephalus* und *Ascaris* Entwicklung. Präliminarnote. *Centralbl. Bakt.*, *1*, 131-132.

19) 1887 - Bestimmung der vier von Dr. E. Parona in einem kleinen Mädchen aus Varese (Lombardei) gefundenen Taenien (*Taenia flavopunctata*?). *Centralbl. Bakt.* *1*, 257-259.

20) 1887 - *Filaria inermis* (mihi), ein Parasit des Menschen, des Pferdes und des Esels. *Centralbl. Bakt.*, *1*, 617-623.

21) 1887 - Come la *Taenia nana* arrivi nel nostro organismo. Nota preliminare. *Giorn. anat. fisiol. patol. anim. dom.*, *19*, 153-156.

22) 1887 - Entwicklungcyclus der *Taenia nana*. *Centralbl. Bakt.*, *2*, 305-312.

23) 1888 - Ciclo evolutivo della *Spiroptera* (*Filaria*) *sanguinolenta*. Nota preliminare. *Giorn. anat. fisiol. patol. anim. dom.*, *20*, 99-101.

24) 1888 - Ancora sul ciclo evolutivo della *Spiroptera sanguinolenta* e sulle larve di nematodi della pulce. Seconda nota preliminare. Saronno, Tipogr. C. Volonté.

25) 1888 - La pulce del cane (*Pulex serraticeps*, Gervais) è l'ordinario ospite intermedio della *Taenia cucumerina*. Nota preventiva. *Boll. Soc. entom. ital.*, *20*, 66.

26) 1888 - *Taenia flavopunctata* Wein, *Taenia leptocephala* Creplin, *Taenia diminuta* Rud. *Atti Acc. Sc. Torino*, *23*, 492-501.

27) 1888 - Beiträge zur Kenntniss des Entwicklungscyclus von fünf Parasiten des Hundes. (*Taenia cucumerina* Goeze; *Ascaris marginata* Rud.; *Spiroptera sanguinolenta* Rud.; *Filaria immitis* Leidy u. Haematozoon Lewis). *Centralbl. Bakt.*, *4*, 609-621.

28) 1888 - Nachtrag zu meinem Aufsatze: Beiträge zur Kenntniss des Entwicklungscyclus von fünf Parasiten des Hundes. *Centralbl. Bakt.*, *4*, 776-777.

29) 1888 - Weiteres zur Frage des Ascarisentwicklung. *Centralbl, Bakt.*, *3*, 748-749.

30) 1888 - Brevi spiegazioni a proposito dell'articolo del Parona sui botriocefali. *Gazz. med. ital. lomb.*, *48*, 20.

31) 1888 - Ancora sul botriocefalo. *Gazz. med. ital. lomb.*, *48*, 304.

32) - 1889 - Frequenza dell'echinococco in Sicilia. *Boll. Acc. Gioenia*, Catania dicembre, pagne 3.

33) 1901 - Ueber tierische Parasiten, insbesondere über die Mosquitos als Ueberträger der *Filaria*, Malaria und des gelben Fiebers. *Umschau 5*, 941-948.

LAVORI IN COLLABORAZIONE

34 GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1884): L'anguillola (Rhabdonema). *Gazz. med. ital. lomb. 44*, 492-494.

35) GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1884): Intorno ad una malattia parassitaria (cachessia ittero-verminosa o cachessia acquosa o marciaja). *Atti Acc. Gioenia, Catania, 18*, 229-234.

36) GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1887): Einige weitere Nachrichten über die *Taenia nana*. Zweite Prälimінarnote. *Centralbl. Bakt., 2*, 282-285.

37) GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1888): Uber einen Echinonhynchus, welcher auch in Menschen parasitirt und dessen Zwischenwirth ein *Blaps* ist. *Centralbl. Bakt., 3*, 521-525.

38) GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1888): Bandwürmerentwicklung. *Centralbl. Bakt., 3*, 174.

39) GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1889): Ciclo evolutivo di una filaria del cane. *Boll. Acc. Gioenia, Catania*, aprile: 5-7.

40) GRASSI B. e CALANDRUCCIO S. (1890): Ueber Haematozoon Lewis. Entwicklungcyclus einer Filaria (*Filaria recondita* Grassi) des Hundes. *Centralbl. Bakt.* 7, 18-26.

41) GRASSI B. e FERRARA (1886): Zur Bothriocephalusfrage. Offener Brief an den hochgeehrten Herrn Medicinalrath Dr. F. Küchenmeister. *D. Med. Wochshr., 12*, 699.

42) GRASSI B. e NOÈ G. (1900): Propagazione delle filarie del sangue esclusivamente per mezzo della puntura di peculiari zanzare. *Atti R. Acc. Lincei, 9*, 157-162.

43) GRASSI B. e PARONA C. (1878): Sullo sviluppo dell'*Anchilostoma duodenale. Studi Labor. Pavia.*

44) GRASSI B. e PARONA C. (1879): Sovra l'*Anguillula intestinale* (dell'uomo) e sovra embrioni probabilmente d'*Anguillula intestinale. Arch. Sc. med., Torino, 3*, 14 pag.

45) GRASSI B. E PARONA C. (1879): Intorno all'*Anguillula intestinalis* parassita dell'uomo. Note Zoologiche e mediche. *Atti Soc. Sc. Nat., Milano, 21*, 855-858.

46) GRASSI B. e PARONA C. (1879): Sovra la *Taenia crassicollis. Atti Soc. ital. sc. nat., 22*, 207-208.

47) GRASSI B., PARONA C. e PARONA E. (1878): Intorno all'*Anchilostoma duodenale*. (Dubini). Annotazione. *Gazz. med. ital. lomb., 38*, 193-196.

48) GRASSI B. e PARONA E. (1879): Intorno all'anchilostomiasi. *Ann. Univ. di Med. e Chir., Milano, 247*, 407-425.

48) GRASSI B. e ROVELLI G. (1887): Contribuzione allo studio dello sviluppo del botriocefalo lato. *Gior. R. Acc. Med., Torino, 35*, 510-519.

50) GRASSI B. e ROVELLI G. (1887): Bandwürmerentwicklung (*Taenia proglottina*) u. Bothriocephalus. *Centralbl. Bakt., 3*, 173.

51) GRASSI B. e ROVELLI G. (1888): Intorno allo sviluppo dei Cestodi. Nota preliminare. *Atti R. Acc. Lincei, 4*, 700-702.

52) GRASSI B. e ROVELLI G. (1888): La *Bilharzia* in Sicilia. *Atti R. Acc. Lincei, 4*, 799.

53) GRASSI B. e ROVELLI G. (1888): Ciclo evolutivo della *Taenia leptocephala*. Nota. Tipogr. Pansini, Catania.

54) GRASSI B. e ROVELLI G. (1889): Sviluppo del cisticerco e del cisticercoide. *Atti R. Acc. Lincei, 5*, 165-174.

55) GRASSI B. e ROVELLI G. (1889): Embryologische Forschungen an Cestoden. *Centralbl. Bakt., 5*, 370-377; 401-410.

56) GRASSI B. e ROVELLI G. (1892): Ricerche embriologiche sui cestodi. *Atti Acc. Gioenia, sc. nat. Catania, 4*, 1-108.

57) Grassi B e Segré R. (1887): Nuove osservazioni sull'eterogonia del *Rhabdonema* (*Anguillula*) *intestinale*. Consideraz. sull'eterogenia. *Rend. R. Acc. Lincei, 3,* 100-108.
58) Parona C. e Grassi B. (1877): Di una specie di Dochmius (*D. Balsami*) *Rend. Ist. Lomb. Sc. Lett., 10,* 190-195.

GLI STUDI ENTOMOLOGICI DI BATTISTA GRASSI

Lidia La Face (*)

E' noto come la prodigiosa attività scientifica di Battista Grassi si sia svolta nei più svariati campi della Zoologia, la scienza da Lui prediletta e nella quale rifulsero le sue eccezionali doti di biologo e di sperimentatore. Per dedicarsi completamente agli studi zoologici aveva rinunziato, poco dopo la laurea, alla professione di medico deludendo le speranze paterne e quelle di un suo maestro, il clinico Orsi di Pavia, ed era andato incontro a sacrifici e ad infinite amarezze prima di ottenere il pieno e giusto riconoscimento dei suoi meriti. Fra tutti i gruppi del regno animale, quello degli Artropodi così ricco per numero e varietà di forme e specialmente quello degli Insetti lo attrassero in modo particolare. Il suo primo studio sugli Artropodi fu quello concernente l'Embriologia delle api, quegli insetti che già avevano destato in Lui così grande interesse da spingerlo, quand'era giovane studente, a collocare due arnie popolate nella sua cameretta del collegio Ghisleri a Pavia. Al periodo fra il 1880 e il 1890, cioè all'epoca in cui la teoria dell'evoluzione affascinava ancora potentemente lo spirito dei biologi e l'indirizzo filogenetico dominava nella Zoologia, risalgono i suoi studi sui Tisanuri e sui Sinfili, piccolissimi Artropodi che sfuggono facilmente all'osservazione comune vivendo nascosti nel terreno. Quattro anni di studi morfologici, condotti col metodo comparativo da Lui seguito in tutte le sue ricerche, lo condussero alla conclusione che « i Tisanuri sono gli insetti più primitivi che si conoscono » e a stabilire la loro grande affinità con i Sinfili. Nel corso di questi studi filogenetici sugli Insetti e sui Miriapodi primitivi, ebbe occasione di scoprire un curioso aracnide, la *Koenenia mirabilis*, che Egli ascrisse, per alcuni speciali caratteri morfologici, ad un nuovo ordine al quale Thoren diede il nome di « Palpigradi ». Tra i suoi studi morfologici e filogenetici sugli Insetti va ricordata anche una breve Memoria in cui Egli fece per primo conoscere l'anatomia degli Embidini che considerò come rappresentanti di un sottordine a sè nel gruppo degli Ortotteri *sensu latu*. Passando più tardi allo studio dei Termiti, dimostrò l'intervento dei fattori epigenetici nel determinismo delle caste, come fu poi confermato da un grande numero di studiosi tra i quali va specialmente ricordato il suo allievo Jucci.

Battista Grassi non fu solo un geniale studioso di Entomologia pura, ma anche un assertore convinto e tenace della necessità degli studi di Entomologia

(*) *Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Parassitologia.*

applicata e ciò in un'epoca in cui gli Insetti, malgrado la nefasta influenza esercitata da molti di essi nell'agricoltura, nella medicina e nella veterinaria, non ricevevano ancora l'attenzione che meritavano ed erano oggetto di approfondite ricerche solo da parte di un numero relativamente esiguo di studiosi, sfuggendo ai più la loro importanza come fattore fondamentale per la vita dell'uomo. Nel nostro Paese, eminenti naturalisti e biologi (come Targioni-Tozzetti, che può dirsi il padre dell'Entomologia agraria in Italia, Franceschini, Del Guercio etc.) avevano richiamato, è vero, l'attenzione sui gravi danni arrecati all'economia nazionale da molti insetti nocivi all'agricoltura, ma le terribili devastazioni che questi causavano nei vigneti, nei campi, nei boschi, erano ancora da troppi considerati come fenomeni naturali che l'uomo non poteva prevenire e combattere. Fino alla seconda metà dell'ottocento, in Italia, come anche altrove, le nozioni sulla trasmissione e sulla diffusione dei germi di tante malattie umane, fra cui la malaria, non avevano fatto sensibili progressi dall'epoca, si può dire, in cui Mercuriale (1530-1606) aveva avanzato l'ipotesi che la peste ed altre malattie (colera, febbre tifoide, tubercolosi, antrace) venissero propagate dalle mosche e da quella più recente, in cui il medico romano Lancisi (1654-1720) aveva sospettato che la malaria fosse propagata dalle zanzare con le loro punture. Si era giunti verso il 1880 senza che l'Entomologia medica (intesa come scienza che studia non solo gli Insetti, ma tutti gli Artropodi vettori di agenti patogeni o causa diretta di malattie) avesse iniziato quel rapido sviluppo che doveva condurla ad affermarsi, in tempi recenti, come branca a sè della Parassitologia, quantunque alcune notevoli scoperte avessero già dimostrato le relazioni fra Insetti ed alcune malattie parassitarie. Stein (1852) e Leuckart (1867) avevano infatti dimostrato come alcuni insetti siano spesso infettati da forme di Nematodi e di Cestodi che possono avere come ospite definitivo l'uomo, Fedschenko (1869) aveva scoperto che il *Dracunculus medinensis* attraversa la prima fase del suo sviluppo in un piccolo crostaceo del genere *Cyclops* e che l'uomo può contrarre l'infezione ingerendo l'acqua inquinata da questi ospiti intermedi, Patrick Manson (1878) aveva indicato una zanzara, il *Culex fatigans*, come ospite intermedio della *Wuchereria* (*Filaria*) *bancrofti*. Ma non si sospettava ancora quanto importante fosse la parte che gli Artropodi, in particolare gli Insetti, hanno nella trasmissione e nella diffusione di gravi malattie dell'uomo. Erano ignoti i trasmettitori della malaria che rendeva spopolate e deserte tante regioni; i flebotomi erano ben noti come insetti fastidiosissimi per le loro dolorose punture, ma non erano ancora incriminati come vettori di malattie; le mosche pullulavano indisturbate nei luoghi dove l'igiene era più trascurata, ma la loro subdola attività come disseminatrici di germi era pressochè sconosciuta: pulci e pidocchi erano considerati come insetti ripugnanti, ma accettati come un inevitabile flagello che accompagna la sporcizia e la miseria ignorandosi

che fossero i vettori ai quali si doveva attribuire lo spaventoso dilagare delle epidemie di peste e di tifo esantematico.

Battista Grassi, incline per naturale tendenza ad interessarsi di tutto ciò che potesse contribuire al benessere umano e soprattutto a quello del suo Paese, comprese con geniale intuito che fra taluni insetti dovessero ricercarsi i colpevoli della trasmissione di tante malattie d'importanza sociale ed economica e che la lotta contro di queste doveva basarsi sulla distruzione degli insetti vettori dei germi che ne sono la causa. Così pure comprese che solo perfezionando le conoscenze sugli insetti nocivi all'agricoltura si poteva contribuire efficacemente alla soluzione del grave problema dell'alimentazione umana. Era quindi evidente per Lui la grande importanza pratica degli studi di Entomologia applicata. Ma sia i problemi di Entomologia agraria sia quelli di Entomologia medica, Egli sostenne sempre, dovevano essere affrontati con i metodi della scienza pura prima di passare alle applicazioni pratiche. In Lui riviveva lo spirito di Leonardo che aveva ammonito: « Quelli che s'innamoran di pratica sanza scienza son come 'l nocchiero ch'entra in navilio sanza timone o bussola, che mai ha certezza dove si vada », monito che Egli volle sempre rammentare ai suoi discepoli. I problemi di Entomologia applicata furono perciò affrontati da Grassi con lo stesso metodo da Lui seguito negli altri suoi studi di Zoologia pura, cioè non unicamente da sistematico, o da morfologo, o da fisiologo, ma da biologo che si serviva della sistematica come base su cui edificare la biologia in senso stretto o ecologia, della morfologia come mezzo per allargare e consolidare le basi dell'edifizio biologico-sistematico, della fisiologia come mezzo per comprendere le relazioni degli animali con l'ambiente e quelle fra di loro.

Fu Battista Grassi il primo a precisare con impeccabili esperimenti che la mosca domestica può introdurre nel suo intestino e depositare ancora vitali, con le feci, uova di vermi parassiti dell'uomo (*Tricocephalus*, *Taenia*, *Oxyuris*). Ritenne molto probabile che svariati microrganismi patogeni potessero sopravvivere qualche tempo nell'intestino delle mosche ed essere da queste propagati. Alle mosche attribuì, in accordo con Kock, una grande parte nella diffusione del colera. In un breve articolo pubblicato nel 1883, dal titolo « I malefizi delle mosche », richiamando l'attenzione sulle relazioni tra mosche e la diffusione di malattie epidemiche e parassitarie, sostenne la necessità della lotta contro questi pericolosi insetti, necessità che trovò più tardi nell'entomologo americano Howard e nel Berlese i maggiori e più attivi assertori.

Nel 1898, una scoperta importante fu fatta da Smith e Kelbourne, cioè quella della trasmissione della *Babesia bigemina*, causa della febbre del Texas dei bovini, per opera di una zecca, il *Boophilus annulatus;* venne, quindi, provata, per la prima volta, la possibilità della trasmissione di una malattia da protozoi per opera di artropodi succhiatori di sangue. E' probabile che tale scoperta abbia influito (come Silvestri ritenne) a rafforzare in Grassi l'idea che la malaria fosse propagata da peculiari insetti ematofagi e a fargli ripren-

dere gli studi sulla malaria che aveva iniziato a Catania nel 1880 e poi abbandonato per dedicarsi ad altre ricerche.

Dopo LANCISI, altri studiosi (LAVERAN, BIGNAMI, DIONISI, MANSON) avevano avanzato l'ipotesi che le zanzare potessero propagare la malaria, ma senza riuscire ad individuare le specie realmente vettrici dei parassiti malarici. La dimostrazione che la malaria è propagata da peculiari specie di zanzare fu data da GRASSI. La storia delle ricerche che condussero GRASSI alla scoperta del modo di trasmissione della malaria umana e che lo resero celebre in tutto il mondo è già stata trattata egregiamente da SILVESTRI in occasione delle onoranze tributate al Maestro nel 1925, più recentemente dal COTRONEI nel discorso commemorativo da lui tenuto, il 10 aprile di quest'anno, all'Accademia Nazionale dei Lincei, oltre che da parecchi altri. Mi limiterò quindi a rievocare brevemente la grande scoperta. GRASSI giunse a dimostrare che la malaria è trasmessa solo dalle zanzare del genere *Anopheles* servendosi di quello stesso metodo che aveva proposto sin dal 1892 per lo studio dei parassiti ad ospite intermedio e che si riassumeva nella limitazione delle forme sospette per via di comparazione. Partendo dal concetto che se la malaria era distribuita in certe località e in altre no, dovevano essere incriminate della trasmissione della malattia peculiari specie di zanzare proprie delle zone malariche e che se queste particolari specie erano più frequenti nell'epoca in cui i casi di malaria erano più frequenti, dovevano essere considerate enormemente sospette, « vere spie della malaria », compì, dal luglio al settembre del 1898, un accurato studio comparativo delle zanzare esistenti nei luoghi malarici e in quelli non malarici. Dopo un paziente e faticoso lavoro di eliminazione, il 29 settembre del 1898, data memorabile nella storia della Medicina e dell'Entomologia medica in particolare, GRASSI annunciò in una comunicazione all'Accademia dei Lincei che l'*Anopheles claviger* era fra tutte le specie la più sospetta e che poteva definirsi « vero indice, vera spia della malaria », che bisognava ritenere sospetti anche il *Culex penicillaris* e il *Culex malariae* ed escludere il *Culex pipiens*. Il 10 ottobre dello stesso anno annunziò che un suo inserviente (GESUALDO MASCITTI), il quale era stato punto solo da zanzare delle tre specie incriminate, aveva contratto le febbri malariche. Le ricerche successive di GRASSI prolungatesi per tutto il 1899 in collaborazione con BIGNAMI e BASTIANELLI, lo condussero ad escludere il *Culex penicillaris* e il *Culex malariae* come vettori di malaria, a riconfermare che il vero reo era l'*Anopheles claviger* e a stabilire che altre specie anofeliche, cioè il *superpictus* e il *bifurcatus* (var. *plumbeus*), erano da considerarsi capaci di trasmettere la malaria umana. Terminato quindi il progresso indiziario (così Lui si espresse) contro i rei sospetti della trasmissione della malaria, potè stabilire la legge « Non v'è malaria senza anofeli » indicando al mondo intero la via da seguire nella lotta contro il secolare flagello. Una nuova era si aprì per la storia della medicina, anzi per la storia dell'umanità, si può dire, tanto la malaria ha sempre influito sulle vicende

economiche, politiche e militari dei popoli. Sorvolo sugli attacchi velenosi e sulle calunnie anche, che alcuni, o per invidia o per ignoranza o per ambedue le cose, credettero di sollevare attorno alla grande scoperta che sarebbe bastata da sola a dargli gloria imperitura. Sopraffatto dalle molte amarezze, disgustato dall'incomprensione e dall'ingratitudine degli uomini, GRASSI abbandonò, dopo il 1903, la questione della malaria che tanto gli stava a cuore e quanto dev'essergli costato un simile abbandono — per fortuna non definitivo — possiamo immaginarlo facilmente. Non erano trascorsi, infatti, molti anni da quando Egli aveva scritto: « L'unità d'Italia esiste materialmente, in realtà però, vi sono due Italie: l'una prospera, l'Italia non malarica, l'altra decadente, l'Italia malarica ». E quest'Italia malarica fu per vari anni il suo tormentoso pensiero che potè quietare solo rivolgendo la mente ad altri studî.

Sollecito del benessere del suo Paese, GRASSI non poteva disinteressarsi dei problemi dell'agricoltura italiana. Riuscì a fondare nel 1903 un Laboratorio di Entomologia Agraria che trovò la sua sede nei locali angusti ed antiquati dell'Istituto di Anatomia Comparata in Via Depretis e nel quale Egli e i suoi allievi compirono numerose ricerche non solo di Entomologia Agraria, ma anche di Entomologia medica e di Entomologia generale. I mezzi che GRASSI aveva a sua disposizione per il Laboratorio di Entomologia erano minimi (la dotazione annuale era di 1100 lire!): con tutto ciò riuscì a mettere insieme mercè la disinteressata collaborazione di PAOLO LUIGIONI, — entomologo appassionato, intelligente ed altrettanto modesto — una collezione di circa 10.000 specie appartenenti ai vari ordini di Insetti ed una biblioteca composta dei migliori trattati di Entomologia generale ed applicata e di numerose Memorie inviategli in omaggio da ogni parte del mondo. Soprattutto ebbe cura di circondarsi di una schiera di discepoli e di allievi da Lui accuratamente scelti, educati alla ricerca scientifica severa, libera da preconcetti, « all'amore disinteressato del vero ed all'onesta ricerca dei fatti », al sacrificio, all'indifferenza verso tutto ciò che potesse essere comodità di vita. La ristrettezza dei mezzi, che dovevano essere impiegati soprattutto per l'acquisto dei libri e degli istrumenti di laboratorio, non dovevano spegnere l'ardore della ricerca, nè suscitare lamentele per inevitabili disagi. Vi era l'esempio del Maestro che, rievocando il suo passato in un discorso di ringraziamento per le onoranze tributategli in occasione del suo 70° anno di età, ebbe a dire: « gli argomenti dei miei studi hanno spesso richiesto mezzi superiori a quelli di cui disponevo e per poterli compiere, almeno in parte, mi sono adattato ad ogni sorta di sacrifici. Sia per i Murenoidi, che per la Malaria, sia per la Filossera che per il Gozzo ho fatto lunghe peregrinazioni in 3ª classe o a piedi, col viatico di pane e cacio, ho frequentato le più misere trattorie e ho alloggiato nelle più umili locande ».

Fra le ricerche entomologiche compiute sotto la guida costante e sollecita

del GRASSI rammento quelle di GIOVANNI NOÈ sui *Mycterotypus*, minuti ditteri succhiatori di sangue, di ANNA FOÀ sul polimorfismo unisessuale di alcuni Acari e sul baco da seta, di CARLO JUCCI sulla determinazione delle caste nei Termiti e le altre pure interessanti e numerose su afidi e cocciniglie dannosi alle piante e sugli anofeli. Primeggiano su tutte quelle di GRASSI sui Fillosserini, sui Flebotomi, sulla biologia degli Anofeli. Non tutti gli allievi poterono, sia pure lontanamente, accostarsi alle vette a cui giunse il Maestro, ma tutti s'ispirarono al suo ideale, quello di «... portare un contributo, sia pure piccolo, ma sicuro alla scienza» e non dimenticarono mai la sua esortazione: «... Insistere, ancorchè nessuno mostri di apprezzarci, non perdere mai la fiducia nel proprio lavoro...».

La ricerca scientifica non fu la sola attività di BATTISTA GRASSI nel campo dell'Entomologia. Benchè il corso di Anatomia e Fisiologia comparate sot traesse molto del suo tempo poichè Egli, ritenendolo base fondamentale degli studi di Medicina, vi si dedicava con vero amore ed entusiasmo aggiornandolo ogni anno alla luce delle nuove conoscenze, riuscì a svolgere contemporaneamente un corso di Entomologia Agraria frequentato non solo da tutti gli studenti iscritti nella Facoltà di Scienze Naturali, ma anche da parecchi della Facoltà di Medicina, il che non meraviglia perchè Egli era solito risalire dalla trattazione di argomenti speciali a quella di problemi d'indole generale e d'interesse universale.

Il Laboratorio di Entomologia rispondeva inoltre ai frequenti quesiti che venivano sottoposti al suo esame dalla Stazione di Patologia Vegetale, assolveva incarichi diversi affidatigli dal Ministero dell'Agricoltura, forniva a chiunque si rivolgesse ad esso notizie e chiarimenti sia sugli insetti nocivi alle piante sia su quelli dannosi alla salute umana, manteneva, insomma, vivo e costante il contatto fra la scienza pura e i problemi pratici interessanti le più svariate categorie di persone, era l'espressione più viva dell'innata tendenza del grande Biologo a mettere il suo sapere al servizio dell'umanità. HEYMONS che, nel 1914, era stato inviato in Italia dal Governo tedesco allo scopo di organizzare in Germania gli studi di Entomologia applicata prendendo per base ciò che era stato fatto negli altri Paesi, ebbe nella sua relazione parole di sincera ammirazione per l'opera svolta dal Laboratorio di Entomologia dell'Università di Roma.

Passo ora a riferire sulle ricerche di GRASSI riguardanti le Fillosserine, i Flebotomi, e su quelle dei suoi ultimi anni sulla biologia degli Anofeli: esse seguirono alla celebre scoperta della trasmissione della malaria umana segnando tre ulteriori luminose tappe degli studi entomologici del sommo Biologo che meritano di essere particolarmente rievocate.

Gli studi sulle fillosserine

La Fillossera della vite, l'insetto tristemente famoso, che importato verso il 1862 dal Nord America in Europa si era diffuso, nello spazio di circa venti anni, in tutte le regioni viticole europee ed aveva invaso dal 1880 anche i bei vigneti italiani propagandosi con rapidità impressionante e minacciando danni enormi alla produzione vinicola, non poteva lasciare indifferente Battista Grassi: essa destava in Lui non solo l'interesse dello scienziato, ma anche la sensibilità dell'italiano sempre sollecito del bene del suo Paese. Interrotti, dopo il 1903, i suoi studi sulla malaria, cominciò ad occuparsi del problema fillosserico al quale dedicò, per circa quattordici anni, buona parte della sua instancabile attività. Nominato membro della Commissione consultiva per la lotta contro la Fillossera presso il Ministero dell'Agricoltura, aveva avuto occasione, già nel 1904, di muovere fondate critiche alle misure che si andavano praticando per la difesa dei vigneti italiani ed aveva manifestato la sua convinzione che fosse indispensabile una migliore conoscenza della biologia della Fillossera e delle alterazioni da essa prodotte nella vite per poter giudicare con fondamento quanta probabilità di risultato avessero i sistemi di lotta allora adottati e per poter indicare nuovi metodi più efficaci. Comprese anche che per giungere ad una più esatta conoscenza della biologia della Fillossera della vite, era necessario estendere le osservazioni anche alle altre fillossere viventi in Italia, specialmente su quelle viventi sulle diverse specie di Quercus e ciò con quel metodo comparativo che aveva applicato in tanti altri suoi studi e che Egli riteneva « strada maestra per giungere ad un vero alquanto comprensivo ».

Il compito si presentava di una vastità tale da non poter essere svolto da un'unica persona per quanto dotata, come Egli era, di prodigiosa attività donde la necessità per Lui di servirsi di collaboratori. Questi furono: Anna Foà già da vari anni assistente e collaboratrice del Maestro, Remo Grandori che iniziava allora la sua lunga e feconda carriera scientifica, Bianca Bonfigli, ottima ricercatrice che le cure dell'insegnamento distolsero presto, però, dal compito affidatole. Vi era anche l'allora giovanissimo Francesco Neri che già aveva dato prova di non comuni doti di osservatore scrupoloso ed attento. Si aggiunse più tari Mario Topi, delegato antifillosserico e ricercatore accuratissimo ed appassionato. Le ricerche compiute da questi collaboratori di Grassi furono per la maggior parte ispirate e suggerite da Lui: altre furono indipendenti. Battista Grassi lealmente e con la dirittura che gli era caratteristica, riconobbe ampiamente il merito e la fatica di ciascuno, ma è indubbio che anche negli studi sulle Fillosserine, come in altri compiuti in collaborazione con i suoi allievi, Egli rappresentò sempre la mente direttiva e coordinatrice degli sforzi dei singoli, la luce vivida che li illuminò nella via della ricerca.

Uno dei punti della biologia della Fillossera della vite che occorreva pre-

cisare, sfrondare dagli errori che vi si erano addensati intorno, era il ciclo di sviluppo la cui esatta e completa conoscenza appariva a Grassi d'importanza fondamentale per poter dare basi sicure e razionali alla lotta antifillosserica. Ritengo opportuno riassumere brevemente il ciclo di sviluppo della Fillossera della vite secondo la concezione classica accettata sino al 1905, perchè ciò servirà a mettere meglio in rilievo le importanti modificazioni che gli studi di Grassi e dei suoi collaboratori vi apportarono eliminando molti errori che incidevano dannosamente sulle applicazioni pratiche contro l'insetto.

Ecco quello che si leggeva nei trattati di Entomologia sino al 1905 a proposito del ciclo di sviluppo della Fillossera della vite: « Dall'uovo unico fecondato deposto dalla femmina sessuata e chiamato uovo durevole o d'inverno nasce in primavera una larva che può dirigersi o sulle foglie o sulle radici: generalmente essa preferisce scendere sulle radici quando si tratta di viti europee. Nell'un caso o nell'altro essa è destinata a diventare una femmina partenogenetica virginopara detta fondatrice. Questa se va sulle foglie produce galle entro le quali si svolgono parechie generazioni anch'esse partenogenetiche e virginipare: se si fissa sulle radici, dà origine ad innumerevoli generazioni radicicole (generalmente 4 o 5 per anno) anch'esse agame. Ogni madre gallecola depone parecchie centinania di uova; le larve che ne fuoriescono abbandonano la galla materna e vanno a formare nuove galle sulle foglie o discendono sulle radici per fondarvi colonie radicicole. Man mano che l'estate avanza, il numero delle neonate che abbandonano le galle fogliari per passare sulle radici aumenta sino a che tutte finiscono col dirigersi sulla parte ipogea della pianta. Le generazioni gallecole si svolgono solo eccezionalmente sulle viti europee, nelle quali manca di regola la serie delle generazioni epigee della fillossera. Sulle radici, nell'estate e nell'autunno, compaiono forme con abbozzi di ali, le ninfe, che si trasformano in femmine alate: queste raggiungono la parte aerea della pianta e depongono, nelle screpolature della corteccia del tronco e di quei rami che non sono dell'anno, uova di due sorta che danno origine a maschi e a femmine, cioè ai sessuati. Le femmine fecondate depongono l'uovo d'inverno o durevole in questi stessi ambienti e a preferenza sui rami di due anni. Nell'inverno, non si rinviene però soltanto l'uovo durevole, ma si trovano anche numerose radicicole nello stadio di larve, le ibernanti, che riprendono lo sviluppo nella primavera seguente ».

Il ciclo di sviluppo della Fillossera della vite era stato così definito principalmente ad opera di studiosi francesi nella seconda metà dell'800 e si basava in gran parte su concezioni teoriche. Gravi dubbi erano stati sollevati da tempo su alcune di queste concezioni che gli studi di Grassi dovevano poi dimostrare essere errate, ma l'autorità di Balbiani, che veniva considerato come il maggior entomologo del tempo e che le aveva accettate, contribuiva non poco a ritardare il cammino verso la verità. Dominava sopratutto, incontrastato nella scienza e nella pratica, il concetto teorico enunciato dal Balbiani

che, cioè, per il perpetuarsi della specie, nella Fillossera della vite, fosse necessario l'uovo durevole o d'inverno che la femmina sessuata depone in autunno, od anche in estate, uovo destinato a dare origine in primavera ad una fondatrice di nuove colonie. Balbiani non ignorava, è vero, che l'infezione può conservarsi da un anno all'altro sulle radici della vite per mezzo delle forme partenogenetiche ibernanti, ma era di opinione che in questo modo le colonie di fillossera potessero avere solo una vita limitata nel tempo a causa del progressivo affievolirsi della potenza generatrice dell'insetto attraverso il succedersi delle generazioni agame e che perciò senza l'intervento della generazione sessuata, senza l'uovo fecondato (l'uovo d'inverno o durevole), la specie fosse destinata ad estinguersi in un breve numero di anni.

Questo concetto sostenuto dal Balbiani avrebbe dovuto prestarsi a serie obiezioni. Già la mancanza quasi costante di galle sulle viti europee, in regioni dove la Fillossera continuava ad infierire senza che la specie mostrasse segni di estinzione, avrebbe dovuto indicare la mancanza della generazione sessuata e quindi dell'uovo d'inverno: inoltre, se la fecondazione fosse stata necessaria per conservare la capacità generatrice della Fillossera, sarebbe stato sufficiente distruggere l'uovo d'inverno — il solo fecondato— per domare il flagello in un tempo più o meno breve. Ma ammettere questo significava mettersi in contrasto con l'autorità indiscussa di Balbiani. Poco si tenne conto di alcuni esperimenti compiuti in Francia dal Boiteau, che era riuscito ad allevare la Fillossera in recipienti chiusi — in modo da escludere l'intervento delle alate e quindi delle forme sessuate — per sei anni consecutivi, ottenendo 25 generazioni senza constatare una diminuzione del potere riproduttivo nelle sue colonie di fillossere. Si obiettava al Boiteau che le forme sessuate potevano essere sfuggite alla sua osservazione. Si richiamava anche in proposito un fatto segnalato dal Balbiani, ma che nessuno, a dire il vero, aveva mai confermato, e, d'altra parte, erroneo: quello della presenza sulle radici di sessuati. Così pure quello della presenza sulle radici dell'uovo d'inverno segnalata da Fatio e dovuta certamente ad un errore di osservazione.

Vi era un altro quesito imbarazzante che attendeva risposta: quello riguardante la ragione per cui le viti europee non presentano galle fillosseriche all'infuori di casi eccezionali. Era stato dimostrato, è vero, con tutta certezza (per opera specialmente di Balbiani e di Boiteau) che la larva nata dall'uovo durevole si fissa, si sviluppa e si moltiplica sulle foglie di alcune viti americane e che solo in casi da considerarsi eccezionalissimi si comporta ugualmente sulle viti europee, ma alla domanda se la prima larva fondatrice schiusa dall'uovo durevole potesse passare direttamente sulle radici evitando le generazioni gallecole, si era data una risposta affermativa non già in base ad osservazioni dirette ed all'esperimento, ma per ragioni teoriche. Poichè, secondo le vedute di Balbiani, la larva fondatrice poteva adattarsi indifferentemente alla vita epigea e alla vita ipogea, si dava senz'altro come stabilito che la

larva della fondatrice nata sulle viti europee, non potendo adattarsi a vivere sulle foglie, potesse rifugiarsi sulle radici. La soluzione del quesito era stata accettata di buon grado perchè dava una spiegazione della mancanza di galle fillosseriche sulle viti europee senza contrastare al concetto di BALBIANI, quello del necessario intervento della generazione sessuata. Neppure il successivo ricredersi del BALBIANI stesso sulla possibilità che dall'uovo d'inverno potesse generarsi tanto una larva gallecola quanto una radicicola, neppure l'esito negativo degli esperimenti di BOITEAU e di FRANCESCHINI che avevano tentato inutilmente di fare vivere sulle radici larve schiuse da uova durevoli, riuscirono a sgombrare dalle menti un concetto errato che l'autorità di BALBIANI aveva così ben fissato. Il passaggio diretto sulle radici delle neonate appena schiuse dall'uovo durevole era stato persino ammesso, nel 1904, come un fenomeno scientificamente provato da HENNEGUY, allievo di BALBIANI e suo continuatore: era stato anche ammesso da FRANCESCHINI, da DEL GUERCIO, dal TARGIONI-TOZZETTI, dai tedeschi RITTER e RÜBSAAMER. Tutto ciò senza che alcuna prova sperimentale fosse stata apportata e quantunque dall'epoca di BALBIANI al 1905 il concetto della necessità della riproduzione sessuata per il perpetuarsi della vita della Fillossera avesse perduto non poco terreno, nessuna ricerca obiettiva diretta alla soluzione del problema era stata attuata. La facile soluzione del problema basata su concezioni teoriche non poteva soddisfare lo spirito di BATTISTA GRASSI, l'uomo avvezzo a chiedere la risposta agli enigmi della Natura all'esperimento ed all'osservazione diretta. A GRASSI sembrava improbabile che dall'uovo d'inverno potesse svilupparsi una larva capace di vivere sia sulla parte epigea della vite che su quella ipogea, che una neonata gallecola obbligata dall'istinto a vivere sulle foglie potesse volgersi ad una meta opposta e vivere sulle radici, che preferisse a volte la luce e il sole e altre volte la vita sotterranea. Egli vedeva quindi la necessità di assodare con esperimenti estesi e decisivi il destino della larva schiusa dall'uovo d'inverno, comprendeva che questo doveva essere il punto di partenza delle ricerche dirette a chiarire il ciclo di sviluppo della Fillossera. Ideò perciò un piano di osservazioni e di esperimenti da compiersi nell'Osservatorio Fillosserico di Fauglia, costituito nel 1905 dal Ministero di Agricoltura, e ne affidò l'esecuzione dapprima soltanto ad ANNA FOÀ con l'aiuto del NERI. Nell'estate del 1905, non fu possibile rinvenire a Fauglia alate di Fillossera in quantità tale da poter ottenere da esse un numero di sessuati e quindi di uova d'inverno sufficiente per gli esperimenti. Perciò nell'anno successivo (1906), inviò a Fauglia, oltre la FOÀ, anche il GRANDORI, allora studente, per dare maggiore estensione alle ricerche. Il risultato di queste non fu troppo diverso da quello precedente. Per poter compiere esperimenti conclusivi, occorreva disporre di materiale abbondante, di molte uova d'inverno. La ricerca di quest'ultime fu poco fruttuosa anche nell'Italia settentrionale: in Sicilia, invece, specialmente a Palermo, se ne trovò una grande quantità sulle viti americane nei primi mesi del 1907.

Ceppi di viti americane ricchi di uova d'inverno furono trasportati con ogni precauzione da Modica e da Palermo a Fauglia ed una vasta serie di esperimenti fu impiantata. Pezzetti del tronco e del legno di due e più anni, ricchi di uova durevoli, furono fatti aderire a viti europee mantenendoli con mezzi opportuni in condizioni tali da permettere la normale schiusura delle uova. Come controllo furono allestite alcune viti americane come quelle europee. Mentre sulle viti americane comparvero le galle come se le uova durevoli fossero state deposte sulle piante stesse, sulle viti europee non si ottennero che rarissime galle ed in nessun caso si produsse l'infezione delle radici per mezzo della larva fondatrice originatasi dall'uovo d'inverno. Altri esperimenti molto importanti furono fatti seppellendo al piede di viti europee numerose galle della seconda generazione (contando come prima la galla fatta dalla fondatrice nata dall'uovo d'inverno) in cui le neonate non avevano ancora carattere di radicicole: nessuna di queste viti si infettò di fillossera alle radici, fatto che dimostrò all'evidenza l'istinto che porta necessariamente le neonate con carattere di gallecole sulle foglie. Gli esperimenti di controllo fatti seppellendo al piede di viti europee galle delle generazioni successive contenenti neonate aventi caratteri di radicicole produssero prontamente l'infezione. Fu dimostrato quindi in maniera irrefragabile che la fondatrice sviluppatasi dall'uovo d'inverno ha sempre carattere di gallecola, che tra le neonate gallecole delle successive generazioni alcune sono invariabilmente destinate alla vita epigea (neogallecole-gallecole) altre alla vita ipogea (neogallecole-radicicole). Dimostrato che il prodotto dell'uovo d'inverno sulle viti europee è destinato a perire, ne derivava la conseguenza che là dove non esistono viti americane con galle, la fillossera si riproduce esclusivamente per partenogenesi sulle radici. Cadeva quindi necessariamente l'errato concetto teorico enunciato da Balbiani, quello della necessità dell'intervento della generazione sessuata nel ciclo biologico della Fillossera della vite. Queste importanti conclusioni sono riportate in una nota pubblicata nel 1907 da Grassi insieme ad Anna Foà. Riferendosi a questi suoi primi esperimenti Egli così si esprime: « L'esito di questi esperimenti fu del tutto limpido, non turbato da alcuno di quegli incidenti che spesso generano dubbi sul loro significato — e di ciò va data lode anche al nostro inserviente Neri Francesco — onde noi, per quanto ci sforziamo di acuire la nostra critica, non possiamo rivolgere contro di essi alcuna obiezione. Tuttavia fedeli al motto « provando e riprovando » non mancheremo di ripeterli ». Parole che ho voluto riportare fedelmente perchè esse rispecchiano in pieno l'indole dello Scienziato: teso alla ricerca della verità sino al sacrificio, severo critico di sè stesso, a sè stesso applicava con estremo rigore ciò che dai suoi discepoli a ragione esigeva; che non fosse affermata cosa alcuna prima di averla bene assodata con l'esperimento ripetuto più volte. Fedele quindi al motto « provare e riprovare », volle ripetere gli esperimenti compiuti a Fauglia in altre località. Ed è così che lo vediamo in Sicilia compiere, in collaborazione con Gran-

DORI e TOPI, un'altra serie di ricerche sul destino della larva fuoriuscita dall'uovo d'inverno e sulle generazioni gallecole. Vorremo riportare qui in esteso, se fosse possibile, gli esperimenti di GRASSI e dei suoi collaboratori in Sicilia per dimostrare con quale sagacia e scrupolosità Egli cercava sempre di eliminare tutte le possibili cause di errori; ci limitiamo a riferire che le ricerche compiute direttamente da GRASSI nell'Istituto Zoologico di Messina, da GRANDORI nel vivaio di Palermo, da TOPI a Spadafora, confermarono in modo definitivo il potente istinto che guida le neonate dall'uovo d'inverno a dirigersi unicamente verso le foglie, che la madre gallecola in condizioni normali depone sempre uova di due sorta, di cui le une danno origine a larve di tipo gallecolo, le altre a larve di tipo radicicolo e che le apparenti eccezioni a questa regola sono dovute a cause totalmente estrinseche, cioè a condizioni anormali di ambiente in cui la madre può venire a trovarsi. Solo in condizioni anormali, ad es. in seguito a prolungata ed assoluta siccità, si possono avere da una madre gallecola solo neo-radicicole, come pure può accadere che l'infezione gallecola si possa spegnere del tutto anche sulle viti americane.

Una buona parte delle ricerche in Sicilia nel 1908 furono compiute da GRANDORI secondo le direttive di GRASSI. GRANDORI, valendosi di ingegnosi dispositivi da lui ideati, compì numerose e pazienti osservazioni sulle generazioni gallecole nelle viti americane che confermarono l'esistenza delle due sorta di neonate gallecole (neogallecole-gallecole e neogallecole-radicicole), misero in luce il variare del rapporto tra il numero delle gallecole e quelle delle radicicole figlie di una stessa gallecola con il succedersi delle generazioni e con la qualità del vitigno. GRANDORI studiò anche la possibilità dello sviluppo delle neogallecole-gallecole sulle radici e il destino di quelle forme intermedie tra neogallecole-gallecole e neogallecole radicicole che già erano state osservate nel 1907 da GRASSI e FOÀ a Fauglia. A GRANDORI si deve anche lo studio dettagliato dei particolari morfologici della neonata dall'uovo d'inverno, come pure delle neonate delle successive generazioni. Le indagini sulla biologia delle medesime generazioni gallecole sulle viti europee già iniziate nel 1907 da GRASSI e FOÀ a Fauglia, riprese nel 1908 direttamente da GRASSI nell'Istituto Zoologico di Messina e in collaborazione con GRANDORI a Palermo, chiarirono le enormi difficoltà che la serie gallecola trova per svilupparsi sulle viti europee anche in quei casi eccezionalissimi in cui essa non si spegne fin dal principio. Le ricerche sulle generazioni gallecole nelle viti europee furono continuate dal 1909 al 1911 dal TOPI prima a Spadafora e poi a Palermo. A TOPI si devono interessanti osservazioni sull'influenza del vitigno e delle condizioni esterne sulla produzione delle neogallecole-gallecole e delle neogallecole-radicicole, la disposizione delle galle nei vari vitigni, le modalità con cui le neogallecole con caratteri di radicicola raggiungono le radici.

Stabilito dalle ricerche di GRASSI e dei suoi collaboratori il diverso comportamento della forma gallecola sulla vite americana resistente e sulle viti

europee, scaturirono di conseguenza le ragioni vere della scarsa importanza che hanno le forme alate per la diffusione della Fillossera sulle viti europee, questione di cui si erano occupati, fra gli altri, TARGIONI-TOZZETTI e FRANCESCHINI senza poterla chiarire. Le ragioni erano quelle che risultavano in maniera inconfutabile dagli esperimenti di GRASSI e della sua scuola: poichè il prodotto dell'uovo d'inverno deposto sulle viti europee è destinato a perire, dato che esso è deposto dalla femmina sessuata e che la femmina sessuata deriva dall'alata, quest'ultima non ha importanza per la disseminazione della specie sulla vite europea, ma lo ha solo per le viti americane. Donde la conclusione pratica importantissima: la diffusione della Fillossera sulla vite europea avviene solo con le forme radicicole partenogenetiche, forme che, contrariamente al concetto sostenuto da BALBIANI della necessità della generazione sessuata, conservano la loro prolificità per un numero indefinito di generazioni. La necessità della riproduzione sessuale nel ciclo di sviluppo della fillossera della vite non poteva, però, essere esclusa definitivamente secondo GRASSI, finchè rimaneva il dubbio dell'esistenza di forme sessupare sulle radici, analoghe a quelle che aveva avuto occasione di osservare in differenti fillossere della quercia. Riprese quindi, con la sua assistente ANNA FOÀ, lo studio delle ninfali, cioè di quelle forme a carattere intermedio fra radicicole attere ed alate, che depongono uova conservando in complesso il carattere di ninfa e che aveva potuto osservare in tutte le specie di fillossere dove esistono forme alate. Le ninfali sulla Fillossera della vite erano già state osservate in numero limitatissimo (tre in tutto) dal MORITZ che le aveva ritenute come anomalie. GRASSI e FOÀ rinvennero le ninfali molto comuni specialmente sulle viti americane dove si producono anche molte alate e poterono stabilire che dalle loro uova si sviluppano radicicole attere. Solo una volta nel settembre del 1909, ANNA FOÀ, s'imbattè in una ninfale, contenente un uovo che per le sue dimensioni poteva riconoscersi come uovo di sessuata. Poichè solo in qualche rarissimo caso da una ninfale si possono sviluppare individui anfigonici, è estremamente improbabile che si rinvengano sessuali sulle radici e rimane pienamente giustificata l'aggiunta fatta da GRASSI e FOÀ alle quattro forme adulte partenogenetiche già note del ciclo di sviuppo della Fillossera della vite di una quinta forma, verginipara partenogenetica: la ninfale.

Per quanto riguarda la biologia delle alate, molte concezioni errate furono demolite dalle osservazioni e dagli esperimenti di GRASSI. Con la stessa precisione con cui aveva dimostrato che il destino delle uova che danno origine alle larve delle generazioni gallecole è già determinato al momento della deposizione, nel senso che alcune sono destinate a dare origine a neogallecole ed altre a neoradicicole, Egli dimostrò, in base ad argomenti morfologici e sperimentali, che il destino dell'uovo deposto dalle radicicole non è determinato al momento della deposizione: la neo-radicicola può orientarsi verso una forma adulta di radicicola attera virginopara o verso la forma alata sessupara

a seconda delle circostanze in cui si sviluppa. Con altri esperimenti accurati ed in collaborazione con Topi dimostrò l'importanza di alcuni fattori come il nutrimento, la temperatura e l'umidità sullo sviluppo delle alate, ma fece anche rilevare che questo non poteva dipendere unicamente da tali fattori, ma che il fenomeno della produzione delle alate doveva trovare la sua completa spiegazione nelle mirabili correlazioni che passano tra la vegetazione delle piante e i loro parassiti.

Seguendo le direttive del Maestro, Mario Topi giunse alla soluzione definitiva di un'altra dibattuta questione, quella riguardante lo sviluppo di alate nelle galle: dimostrò cioè che non si verifica mai il fatto che una neogallecola-gallecola si evolva in forma alata. Grassi e Topi stabilirono che le rarissime alate che avevano riscontrata eccezionalmente, in Sicilia, nei mesi di settembre e di ottobre, su alcuni vitigni, specialmente su ibridi europeo-americani nei quali l'infezione gallecola si protrae più a lungo, non rappresentavano una forma alata della fillossera gallecola, ma alate evolutesi eccezionalmente, da neogallecole-radicicole. Cadeva così definitivamente quel parallelismo che il Franceschini aveva creduto di poter stabilire fra il ciclo della fillossera gallecola e quello della fillossera radicicola, nella supposizione che tanto l'una quanto l'altra potesse produrre alate e per conseguenza sessuati ed uova durevoli.

Un altro errore demolito dagli studi di Grassi fu quello che vi potessero essere due sorta di alate come qualcuni riteneva: alate virginopare ed alate sessupare distinguibili, secondo Staüffacher per essere le prime sprovviste e le seconde fornite di uno speciale organo di senso statico da lui descritto. Grassi provò che quest'organo di senso non esiste e che le alate sono tutte sessupare.

In definitiva:

L'imponente mole dei fatti dimostrati da Grassi e dai suoi collaboratori stabilì in modo chiaro, netto e preciso, che mentre sulle viti americane resistenti la Fillossera compie il suo ciclo di vita normale attaccando le parti aeree ed anche le radici, ma a preferenza la parte epigea della pianta, sulle viti europee, invece, il ciclo biologico della Fillossera si riduce ad una serie di generazioni partenogenetiche radicicole che si mantengono ininterrotte, indipendentemente dall'infezione delle parti epigee, per un tempo indeterminato. Trasportata sulla vite europea, la Fillossera è diventata quindi essenzialmente un parassita delle radici.

Collegato alla persistenza, indeterminata nel tempo, della Fillossera sulle radici delle viti europee, un altro fenomeno del più grande interesse pratico, si era presentato alla mente di Grassi: il fenomeno dell'ibernamento, per il quale, com'è noto, l'infezione sulle viti europee si mantiene da un anno all'altro. Grassi affrontò lo studio di questo fenomeno con la collaborazione di Foà, Grandori e Topi. Già in altre forme di Phylloxerinae (*Ph. quercus*, *Acanthaphis*

spinulosa, Moritziella corticalis) Grassi e Foà avevano riscontrato le ibernanti, ma in numero scarsissimo. L'enorme abbondanza delle ibernanti sulle viti europee e la relativa scarsità di esse sulle viti americane resistenti usate come porta innesto avevano suggerito a Grassi l'idea che le ibernanti avessero l'ufficio di compensare in un certo modo la mancanza sulle viti europee delle generazioni derivate dalle fondatrici uscite dall'uovo d'inverno.

Anche qui la potenza del Suo intuito fu confermata dalla realtà dei fatti. Le ricerche di Grassi e Foà chiarirono infatti la diversa importanza delle ibernanti a seconda che si tratta di viti europee o di viti americane. Mentre sulle viti europee le ibernanti abbondano, sulle viti americane resistenti esse sono per contro scarsissime sino a poter mancare completamente. Perciò se sulle viti americane non viene deposto l'uovo d'inverno, esse si disinfestano spontaneamente, eventualità che sulle viti europee non si verifica mai. A Grassi non poteva, inoltre, soddisfare la relazione, un pò troppo semplicistica, stabilita da altri, tra il fenomeno dell'ibernamento e l'abbassamento della temperatura. Non gli sfuggì che nel determinismo del fenomeno s'inseriscono le interazioni fra due esseri vivi: la Fillossera e la vite, con tutte le complicazioni che ne derivano. Dalle osservazioni di Grassi, Foà, Grandori e Topi, compiute in Toscana e in Sicilia, emersero le mirabili correlazioni che esistono tra l'ibernamento (e il fenomeno analogo dell'estivamento) e le cause che producono l'arresto della vegetazione della pianta, (temperatura, siccità, influenza del terreno, ecc.) furono chiariti pure i fattori che influiscono sul risveglio delle ibernanti e stabilito pure in maniera definitiva che tutte le ibernanti hanno il carattere di neoradicicole, che da esse derivano unicamente radicicole, mai forme alate.

Lo studio delle neoradicicole condusse Grassi a chiarire meglio i modi naturali di diffusione della Fillossera. Insieme a Topi potè precisare che mentre le alate rappresentano un mezzo di diffusione della specie dove esistono viti americane adatte a produrre galle, le neonate radicicole, che fuoriescono dal terreno, rappresentano il modo ordinario di diffusione naturale dell'insetto nella vite europea e in quelle viti americane refrattarie alla produzione di galle, conclusione questa importantissima per la pratica. Altre importanti osservazioni furono fatte da Grassi e dai suoi collaboratori Foà, Grandori e Topi sulle forme sessuate della Fillossera, sul numero delle mute, sulla variabilità del rapporto numerico fra gli individui dei due sessi, sulla longevità, ecc. Dagli esperimenti e dalle osservazioni di Grassi e della Sua scuola, il quadro classico del ciclo di sviluppo della Fillossera uscì in definitiva profondamente mutato, sfrondato da tutti gli errori e da tutte le incertezze, completato in tutte le sue lacune e ciò a prezzo di sacrificio e di lavoro enormi.

Grassi non trascurò di dare alle ricerche biologiche sulla Fillossera della vite la base morfologica indispensabile, cosa che non era stata fatta in precedenza, per cui le nozioni che si avevano in proposito erano solo incomplete ed imprecise. Non è possibile qui riferire le minute, pazienti ricerche compiute al

riguardo da Lui stesso, da Grandori, Foà e Topi sulla morfologia di tutti gli stadi della Fillossera che compaiono sia nelle generazioni epigee che in quelle ipogee: esse costituiscono un capolavoro di esattezza, di potenza ed acume di osservazione. Nè mancarono le ricerche anatomo-comparate estese nei punti principali a tutti gli apparati. Alle ricerche sulla Fillossera della vite si aggiunsero quelle, come si è detto, sulle altre fillossere viventi in Italia, specialmente su quelle viventi sulle diverse specie di *Quercus*. Ciò fece in collaborazione con Anna Foà e Bianca Bonfigli. Furono in tutto descrtte dodici specie di Fillosserini italiani tra i quali figurano quattro specie nuove, con una discussione dei vari caratteri, in base ai quali furono stabiliti anche vari nuovi sottogeneri e meglio definiti quelli già conosciuti. Vennero fissati esattamente la nomenclatura e i caratteri di ciascuna specie, esposti i cicli evolutivi di dieci specie dei quali sei furono fatti conoscere per la prima volta e quattro meglio precisati e corretti rispetto a quanto ne avevano scritto i precedenti autori.

Lo studio della Fillossera della vite condusse Grassi a considerare anche alcuni massimi problemi d'indole generale con una base di fatti molto più solida di quanto prima di allora si possedeva. Questi problemi erano quelli del dimorfismo preindotto e indotto e della riduzione in alcune forme delle ali e del sistema digerente. Circa il destino delle due sorta di uova derivate dalle femmine attere virginopare gallecole e che danno origine le une solo a neogallecole-gallecole e le altre solo a neogallecole-radicicole, le esperienze che il Topi eseguì, consigliato da Grassi, dimostrarono che se mutando le condizioni di ambiente non si arriva ad influire sulle uova già deposte, si può, però, facendo variare la natura del vitigno, quindi l'ambiente, esercitare sulla madre gallecola virginopara attera in via di sviluppo un'influenza evidente che si traduce in una mutazione della percentuale delle due sorta di neogallecole. Condizioni di vita sfavorevoli sulle foglie fanno si che la madre gallecola produca a grande preferenza esclusivamente radicicole. Non si può negare, quindi, secondo Grassi, che la genitrice sia ereditariamente predisposta a queste mutazioni e che nel fenomeno intervengano quindi, in contrasto fra loro, cause interne (predeterminazione) e cause esterne (preinduzioni). Ciò, fa rilevare Grassi, trova un interessante riscontro in ciò che si verifica in altri animali, nei Rotiferi e nelle Dafnie. Dalle ricerche sulle Dafnie di Woltereck, confermate e completate da Schaffenberg e Papanikolau, risulta che in questi crostacei la tendenza a produrre sessuali è nulla nella prima generazione partenogenetica e i fattori esterni non possono esercitarvi alcuna azione, mentre nelle generazioni successive si manifesta e si accentua la tendenza alla sessualità e i fattori esterni fanno sentire la loro influenza. La formazione dei sessuali dipende dunque da due fattori che si controbilanciano: l'interna potenza sessuale e l'azione di agenti esterni. Analogamente, nella Fillossera della vite, la tendenza a produrre radicicole che si va accentuando nelle generazioni suc-

cessive a quella della fondatrice gallecola derivata dall'uovo d'inverno potrebbe esprimere una tendenza al ritorno alla sessualità, che si raggiunge attraverso l'alata, tendenza sulla quale i fattori esterni possono esercitare la loro influenza. « Questo parallelo tra il dimorfismo delle Dafnie — scrive GRASSI — e quello della Fillossera gallecola a noi sembra che non indichi un superficiale riscontro, ma accenni con sicurezza ad una intima somiglianza della natura del fenomeno ».

Una seconda forma di dimorfismo che GRASSI distinse come non predeterminato, ossia indotto, è quello presentato dalle neogallecole-radicicole nipoti della fondatrice, cioè da quelle forme che a cominciare dalla terza generazione, possono, sulle radici, svilupparsi o no in alate. Sperimentalmente, col mutare di alcune speciali condizioni (specificità della vite ospite, nutrimento, temperatura, umidità etc.) forme che avrebbero potuto diventare attere virginopare diedero luogo ad alate sessupare e viceversa. Pur dando alla differenziazione delle neoradicicole in virginopare e in sessupare il significato di un dimorfismo non predeterminato, GRASSI ritenne che le condizioni che regolano la distinzione non risiedessero tutte nell'ambiente, ma che una parte di esse, anzi la più importante, si dovesse ricercare nell'essere stesso, bipotente per eredità e capace di sviluppare l'una o l'altra potenza a seconda dell'ambiente.

Non meno interessanti sono i casi di rudimentazione nei Fillosserini collegati alla vita parassitaria, il cui studio GRASSI consigliò ad ANNA FOÀ e a BIANCA BONFIGLI e sapientemente diresse. Questi casi furono da Lui considerati in relazione con quelli presentati da altri Chermesidi e lo condussero a concezioni generali di alto valore, rispecchianti la versatilità e la potenza del Suo genio. Egli sostenne che il fenomeno della riduzione e della scomparsa delle ali nelle Fillosserine e quello della riduzione del tubo digerente non si potevano riferire nè ad una graduale scomparsa per effetto del fattore lamarckiano del disuso, nè alla selezione germinativa di WEISMANN, e consigliò che il tentativo della loro spiegazione si dovesse fare con i metodi sperimentali della Fisiologia dello sviluppo.

L'enorme mole delle ricerche compiute da GRASSI e dalla Sua scuola tra il 1905 e il 1912, in sette anni, durante i quali nessuna fatica e nessun sacrificio furono risparmiati, si trova riunita nella Sua celebre Monografia « Contributo alla conoscenza delle Fillosserine ed in particolare della Fillossera della vite » pubblicata nel 1912, Monografia che fu definita come « opera monumentale » dal BÖRNER, « pietra miliare nella storia dell'Entomologia » dal SILVESTRI, pietra miliare nella storia della Biologia, aggiungiamo noi, perchè Egli, sorvolando i confini dell'argomento speciale che si era proposto di svolgere, s'innalzò a considerare i più ardui problemi che si possono affacciare alla mente di un biologo e indicò la via per giungere alla loro soluzione.

I risultati esposti nella sua Monografia, furono in pari tempo, la base

granitica, inattaccabile su cui GRASSI poggiò le Sue concezioni sull'indirizzo che si doveva dare alla lotta antifillosserica.

Le ricerche di GRASSI sulla Fillossera non si arrestarono con la pubblicazione della Sua celebre Monografia. Tra il 1910 ed il 1924, un'altra questione occupò lo spirito del Maestro: quella dell'esistenza di diverse razze nella Fillossera della vite. Nelle Sue ricerche su questo argomento ebbe spesso a trovarsi in contrasto con il BÖRNER, il quale aveva pur confermato molti dei risultati degli studi di GRASSI e di questi era sincero e leale ammiratore.

Il BÖRNER sostenne che, nella Lorena, la Fillossera, che da circa un quarantennio infestava la vite europea, vi aveva acquistato caratteri biologici speciali tanto da potersi considerare come una varietà distinta che egli chiamò *pervastatrix*. Successivamente, il BÖRNER sostenne che la Fillossera della vite comprendeva due specie distinte anche morfologicamente, che egli indicò con i nomi di *vitifolli* e *vastatrix* aventi come piante ospiti la prima la vite *riparia* e la seconda la vite *labrusca* e la vite europea (*vitis vinifera*). Su questo argomento molte osservazioni ed esperimenti furono eseguiti dal TOPI, sotto la direzione di GRASSI, giungendo alla conclusione che « nè le differenze morfologiche segnalate dal BÖRNER, nè le differenze di comportamento nei riguardi dell'attaccabilità dei diversi vitigni autorizzano ad ammettere l'esistenza di due specie distinte della Fillossera della vite.

In due estese Memorie sulla diffusione della Fillossera nel Teramano, GRASSI dimostrò con dati precisi l'utilità di continuare la lotta in quella regione. In un'altra pubblicazione del 1918, dal titolo « Necessità di non abbandonare la lotta contro la Fillossera », Egli richiamò l'attenzione che in Italia vi era ancora una superficie di oltre 3.000.000 di ettari in cui si coltivava la vite europea senza che la Fillossera vi fosse ancora penetrata o avesse fatto danni sensibili (ad es. non era ancora penetrata nei Castelli romani) ed ammonì che, se non fossero stati opposti freni sufficienti al dilagare del flagello, parecchi miliardi sarebbero andati perduti, con deplorevoli conseguenze per l'economia nazionale.

Non è qui il luogo di giudicare, nè è mio compito farlo, quanto il monito del sommo Biologo sia stato ascoltato: ma ricordiamo che se Egli continuò, si può dire, sino alla vigilia della Sua morte, a combattere con tenacia e con fede perchè fossero adottati nella lotta contro la Fillossera quei principi razionali basati sulle conoscenze acquisite con i Suoi studi, ciò fece non per ambizione personale e desiderio di gloria, ma unicamente perchè in Lui ardeva oltre l'amore inestinguibile per la Scienza un altro non meno grande, quello per il suo Paese che desiderava vedere prospero ed in continuo progresso.

Le ricerche sui flebotomini

Durante il lungo e paziente lavoro di limitazione delle forme atte a trasmettere la malaria, Grassi aveva rivolto la sua attenzione oltre che alle zanzare anche ad altri ditteri ematofagi delle regioni non malariche e malariche, cioè ai Tabanidi, ai Simulidi e, particolarmente, ai Ceratopogonidi e ai Flebotomini. All'epoca degli studi di Grassi sulla malaria, i Ceratopogonidi erano noti soltanto come insetti fastidiosissimi per le loro punture, non sospettandosi il compito di alcune specie nella trasmissione di filarie. Grassi aveva osservato che due specie, il *Mycterotypus bezzii* e il *M. irritans* (volgarmente note con il nome di serapiche), erano frequentissime, tra la fine di giugno e i primi di luglio, nella campagna romana dove non era raro il caso che gli operai nei campi fossero costretti ad abbandonare il lavoro per sfuggire alle loro accanite punture. Il suo allievo Giovanni Noè diede, per primo, la descrizione morfologica esatta delle due specie. Grassi dovette convincersi ben presto che questi minuti moscerini non potevano essere incriminati della trasmissione della malaria. Alla stessa conclusione venne per i Flebotomi che aveva riscontrato tanto nelle zone malariche quanto in quelle non malariche dell'Italia settentrionale e meridionale ed anche nel Lazio, ma intuì genialmente l'importanza di questi insetti come vettori di altre malattie. Dalle più diverse parti d'Italia giungevano a Grassi le preghiere di consigli contro questi insetti molestissimi che in molte località costituivano un vero flagello; in alcuni palazzi di Roma, essi erano così abbondanti da indurre gli inquilini ad abbandonare gli appartamenti e a disdire i contratti di affitto. Non era facile suggerire mezzi di lotta contro i Flebotomi poichè le cognizioni che si avevano su di essi sino al 1899 erano assai scarse ed imperfette. Il Rondani che, nel 1841, in un suo schema di classificazione dei ditteri europei basata sulla struttura dei palpi e delle appendici copulatorie, aveva fatto dei Flebotomi una famiglia a sè distinguendo tre specie (*papatasii, minutus, molestus*) non era andato più in là dei dati necessari di sistematica e questi, come Grassi dimostrò, non erano nemmeno rigorosamente esatti. Non solo difettavano i dati sistematici e anatomici, ma non si conosceva nemmeno in quali ambienti questi insetti compissero il loro sviluppo: si riteneva generalmente ed erroneamente che le fasi giovanili si svolgessero nell'acqua a somiglianza delle zanzare. Anche i costumi degli adulti erano poco noti: si sapeva che essi erano ematofagi e si avevano solo vaghi sospetti sulla loro capacità di trasmettere germi patogeni. Pressat (1905) in un suo libro « Le paludisme et les moustiques » aveva accennato a un dittero abbondante in alcune località dell'Africa e dell'Asia detto in arabo Akl-ou-Skout ossia « mangia e taci » e ritenuto propagatore del bottone d'Oriente, ma non lo aveva classificato: ne aveva pubblicato solo una fotografia nella quale Grassi più tardi, dopo avere compiuto i suoi accurati studi sulla morfologia dei Flebotomi, potè ravvisare un rappresentante di

questa famiglia che doveva essere probabilmente il *papatasii.* GRASSI ebbe sott'occhio dapprima solo questa specie: fece lo studio morfologico e completo dell'insetto allo stadio d'immagine e particolarmente delle parti boccali, del tubo digerente, delle ali, degli apparati sessuali maschile e femminile, eliminando tutti gli errori e le inesattezze in cui erano incorsi coloro che se ne erano occupati in precedenza. GRASSI aggiunse anche interessanti osservazioni biologiche, particolarmente sulle abitudini alimentari e completò le notizie che si avevano sulla diffusione della specie in Italia. Particolarmente difficili furono le ricerche di GRASSI sul ciclo di sviluppo del *papatasii* che si protrassero dal 1899 al 1905 e nelle quali fu molto coadiuvato dal suo abilissimo inserviente GESUALDO MASCITTI, lo stesso che lo aveva fedelmente seguito nelle lunghe peregrinazioni attraverso le Paludi Pontine per rintracciarvi i vettori della malaria. GRASSI riuscì a individuare i luoghi di sviluppo dell'uovo, della larva e della ninfa del *papatasii,* fece di questi stadi una descrizione minutissima ed accurata, stabilì che le uova non vengono deposte nell'acqua, ma nelle grotte, nelle cantine, specialmente in quelle dove si è soliti accumulare materiali da costruzione, fra le pietre, i calcinacci, nelle fenditure dei muri e in generale nei luoghi umidi e scuri, ricchi di sostanze organiche in via di decomposizione, offrenti un terreno adatto per lo sviluppo delle larve. Suppose che un ambiente particolarmente adatto allo sviluppo larvale del *papatasii* fosse costituito dalle piccole anfrattuosità delle pareti delle fogne domestiche avendo frequentemente osservato i flebotomi entrare ed uscire attraverso le imboccature dei tubi.

Su queste osservazioni basò i suoi consigli pratici per ostacolare lo sviluppo del *papatasii,* cioè quelli di mantenere levigate le pareti delle fogne e delle cantine, di pavimentare quest'ultime con cemento, di mantenerle pulite e sgombre da materiali da costruzione, di costruire le fogne in modo che fossero abbondantemente lavate dall'acqua immessa e di provvederne l'imboccatura con reticelle metalliche. Basandosi sul fatto che le femmine mature del *papatasii* abbondano in due epoche, cioè alla fine di luglio e verso la metà del settembre, ammise che vi fossero non solo due generazioni annuali, primaverile ed estiva, ma che dovesse esservene necessariamente una terza autunnale avendo potuto stabilire che la specie sverna allo stato di larva.

Mentre stava per licenziare per la stampa queste sue ricerche sui Flebotomi (che furono pubblicate in una Memoria della Società Italiana delle Scienze nel 1907), ebbe occasione di osservare a Roma un'altra specie che distinse dal *papatasii* e denominò *Phlebotomus mascitti.*

Per quanto riguarda gli effetti patologici dei Flebotomi, GRASSI sostenne la necessità di accertare se anche in Italia fosse endemica la così detta febbre dei tre giorni già segnalata in Dalmazia ed Erzegovina e che si riteneva causata da un virus trasportato dai Flebotomi, ribadì che quest'insetti dovevano avere una speciale importanza, sopratutto nei paesi caldi, nella diffusione di malattie parassitarie come il Bottone d'Oriente, precorrendo così le scoperte fatte successi-

vamente sulla trasmissione della leishmaniosi. In definitiva, anche in questo capitolo dell'Entomologia medica le ricerche di GRASSI ebbero un valore fondamentale, segnarono la via maestra seguita con profitto da altri studiosi e indicarono la premessa indispensabile per la profilassi di temibili malattie.

LE ULTIME RICERCHE SUGLI ANOFELI

Nel 1917, GRASSI tornò nuovamente al problema malarico con entusiasmo, con fede e spirito di sacrificio, nonostante l'età avanzata e il declinare del suo fisico. La storia di quest'ultime ricerche del grande Biologo è oltremodo interessante perchè esse aprirono nuovi orizzonti alla lotta antimalarica e perchè in esse, com'è facile dimostrare, sono contenute in germe alcune scoperte fatte da altri successivamente alla sua morte.

Il 1917 fu un anno triste per gli Italiani. Scrive GRASSI: « Le ansie dei brutti giorni del 1917 tormentavano me come qualunque Italiano. Mi mancava ormai la calma di star fermo in laboratorio sul microscopio: il laboratorio del resto era spopolato. Quale migliore occasione per tornare nelle campagne, tra le vittime della malaria, che un tempo mi avevano fatto tanta pietà e mi avevano procurato tante soddisfazioni colla loro riconquistata salute? ».

La località prescelta da GRASSI per riprendere i suoi studi sulla malaria e sugli anofeli vettori fu Fiumicino, nei pressi di Roma, una delle località dell'Agro Romano più fieramente colpite dalla malaria in quel tempo. Linea fondamentale del programma che GRASSI intendeva svolgere a Fiumicino era di associare alla bonifica umana la lotta antianofelica. La lotta antianofelica implicava, però, la necessaria premessa di uno studio profondo, minuto, della biologia degli anofeli. GRASSI ebbe a Fiumicino un prezioso collaboratore, MASSIMO SELLA, che introdusse ingegnosi perfezionamenti tecnici nella lotta contro gli anofeli e compì molte, interessanti osservazioni sui costumi di questi insetti. Il SELLA nel suo lavoro fu coadiuvato a sua volta dall'abile tecnico FRANCESCO NERI e da un suo cugino, ETTORE BORA, la cui opera — come ebbe a dire il GRASSI — « fu instancabile, scrupolosa, superiore ad ogni elogio e presso a poco gratuita ». GRASSI, sempre preoccupato di dare ad ognuno dei suoi collaboratori la sua parte di merito, volle che la seconda parte della Relazione sulla lotta antimalarica a Fiumicino, da Lui pubblicata nel 1920, riguardante le ricerche nel 1918 e nel 1919, portasse il nome del SELLA; « ciò io ho desiderato che fosse fatto — Egli scrisse — perchè è giusto che vada a lui la parte sostanziale del lavoro fatto nel 1919 ». E il SELLA scrisse a sua volta: « Non è il caso che io dica quanto debba in queste ricerche, molte delle quali vennero discusse ed elaborate insieme, al Senatore B. Grassi, Diretore della campagna antimalarica, alla cui Scuola è per me titolo di onore l'appartenere ». Mi si perdoni questa breve digressione: essa dimostra quali leali ed affettuosi legami unissero il Maestro ai suoi discepoli migliori: il che doveva compensarlo dalle amarezze procu-

rategli da altri (pochi invero) che non seppero o non vollero riconoscere gli insegnamenti da Lui ricevuti.

Prima di parlare delle ricerche di GRASSI e SELLA a Fiumcino, desidero ricordare che nei lavori di GRASSI e dei suoi collaboratori la nomenclatura usata per gli anofeli è diversa da quella in uso attualmente; affinchè chi legge possa seguirmi più facilmente, userò la denominazione moderna di *A. maculipennis,* in luogo di quella di *A. claviger* usata da GRASSI, e la denominazione *A. claviger* in luogo di quella di *A. bifurcatus.* Non è facile riassumere in poche parole la lunga serie delle minute e pazienti osservazioni che GRASSI e SELLA compirono sulla biologia delle due specie: *maculipennis* e *claviger* (*bifurcatus*). Si può dire che non vi sia stata alcuna fase della vita di queste due specie che non sia stata oggetto di esperimento rigoroso e di osservazione accurata. Furono studiati infatti minutamente i fattori che influiscono sullo sviluppo delle uova e delle larve del *maculipennis* e del *claviger* nei differenti tipi di acquitrini. Le specie vegetali di questi ambienti furono accuratamente classificate con l'aiuto di CARANO, BEGUINOT e ZANONI, giungendo a distinguere, in complesso. due tipi di vegetazione: la vegetazione orizzontale o superficiale costituita da piante che permettono alle acque di essere sufficientemente illuminate e calde in modo da costituire l'ambiente adatto per il *maculipennis* e la vegetazione verticale, propria degli acquitrini delle macchie, formata da piante a fusto eretto, ombreggianti le acque che permangono più fresche e formano un ambiente adatto al *claviger* o *bifurcatus.* SELLA studiò anche i limiti di salinità delle acque compatibili con la vita del *maculipennis.* Per quanto riguarda la biologia delle alate, tre punti furono presi in particolare considerazione per i rapporti che essi hanno con l'epidemiologia della malaria: l'ibernamento, la digestione del sangue, il numero dei pasti necessari per la maturazione delle uova. Per quanto riguarda l'ibernamento, le osservazioni compiute da SELLA sull'influenza esercitata dalla temperatura sulla attività trofica e genetica del *maculipennis* nella stagione invernale, c'inducono a ritenere che egli abbia compiuto le sue ricerche su popolazioni anofeliche costituite in massima parte da quella specie distinta attualmente nel gruppo *maculipennis* con il nome di *A. labranchiae* e che non è soggetta ad una pausa invernale obbligatoria.

Le ricerche sull'ibernamento portarono alla definizione del diverso ciclo biologico dell'*A. claviger* (*bifurcatus*), le cui alate in inverno scompaiono sopravvivendo la specie solo allo stato larvale, e del *maculipennis* nella quale specie in nessun periodo dell'anno vengono a mancare le alate. Per quanto riguarda il numero dei pasti di sangue necessari al *maculipennis* per maturare le uova, punto importante per l'epidemiologia della malaria, SELLA stabilì che nel *maculipennis* la maturazione e la deposizione delle uova sono portate a compimento con un solo pasto di sangue durante la stagione calda, che digestione e maturazione delle uova sono, in estate, due processi che si compiono parallelamente mentre in primavera, quando gli anofeli riprendono l'attività

genetica, e in autunno, quando il nutrimento viene utilizzato per aumentare le riserve adipose, non vi è più rapporto fra grado di digestione e sviluppo delle uova. Altre interessanti osservazioni furono compiute da Grassi e Sella sugli spostamenti degli anofeli, in particolare del *maculipennis*, dagli ambienti chiusi abitati allo aperto e viceversa. Tutti i segreti dell'esistenza, tutte le mosse del nemico furono studiate con minuzia e con acume: solo così si sarebbe potuto giungere a lottare efficacemente contro di esso.

Grassi rivolse anche particolare attenzione ai rapporti tra animali domestici e anofeli, argomento importante che si ricollegava ad un problema ancora insoluto nel 1918 e che per vari anni ancora doveva affaticare la mente dei malariologi, quello dell'anofelismo senza malaria. Dopo la scoperta degli anofeli malarigeni, Grassi aveva osservato per primo che, in certe località italiane, gli anofeli si cibavano in gran preferenza, od anche esclusivamente, sugli animali domestici anzichè sull'uomo. Come si legge nella sua opera « Studi di uno zoologo sulla malaria » pubblicata nel 1901, Egli mise dapprima in rapporto questo fenomeno con la termofilia degli anofeli; specialmente nelle località in cui le notti sono piuttosto fresche, la bassa temperatura avrebbe spinto gli anofeli, amanti dei luoghi caldi, a raccogliersi nelle stalle e a vivere quindi a spese degli animali domestici. Vedremo come Egli, più tardi, modificasse il suo concetto del rapporto fra termofilia degli anofeli e attrazione esercitata su questi dal bestiame. Queste prime osservazioni di Grassi sui rapporti fra animali domestici e anofeli rappresentarono il terreno su cui germogliò l'idea dell'utilizzazione pratica della zooprofilassi: aumentando i ricoveri degli animali domestici, dove gli anofeli sarebbero stati attratti dal tepore e dal bisogno di cibo, si sarebbe potuto salvare l'uomo dalle loro punture. Questa idea, propugnata per il primo dal Bonservizi, offriva una soluzione del problema malarico alquanto semplice, ma che non poteva soddisfare lo spirito del grande Biologo, il quale vedeva la necessità di collegare allo studio dell'efficacia della zooprofilassi quello minuzioso delle abitudini alimentari degli anofeli e dei cibi preferiti da essi, donde la sua raccomandazione che fossero intensificate anche le ricerche sugli organi di senso degli anofeli in rapporto alla scelta degli animali ospiti. « Lo studio dei sensilli del gusto e dell'olfatto degli anofeli — Egli disse — approfondito metodicamente dovrebbe condurre a scoperte di grande interesse pratico e condurci alla difesa delle loro punture ». Volendo precisare meglio i rapporti tra anofeli e bestiame. Grassi visitò, nel 1918, tre località classiche di anofelismo senza o quasi senza malaria: gli Orti di Schito, tra Castellammare di Stabia e Torre Annunziata, Alberone, presso Chignolo Po inprovincia di Pavia e Massarosa in provincia di Lucca, mettendo in rilievo l'importanza degli animali domestici come fattore antimalarico, il che fu confermato dalle ricerche compiute, nel 1919, da Sella a Fiumicino.

Ricerche sui rapporti tra animali domestici e malaria venivano contempo-

raneamente condotte dal ROUBAUD in Francia, il quale concludeva, ma senza sufficienti prove sperimentali, che dove gli anofeli trovavano nel bestiame un'alimentazione sanguigna sufficiente, essi non pungevano l'uomo e che nelle regioni non malariche essi avevano orientato le loro abitudini ematofaghe verso il bestiame, il che avrebbe provocato la genesi di una particolare razza di anofeli, razza zoofila, distinguibile anche per le maggiori dimensioni e per il maggiore numero di dentelli mascellari. In una memoria comparsa nel 1920, ROUBAUD espose queste sue ricerche, senza tener conto delle osservazioni che GRASSI aveva già fatto sui rapporti tra animali domestici e malaria e che erano state da Lui pubblicate, nel 1919, nel Bulletin dell'Office International d'Hygiène Pubblique; sembra, invero, strano, data la diffusione di questo periodico, che gli siano sfuggite. E cosa ancora più strana, ROUBAUD non tenne conto nemmeno delle prime osservazioni sull'argomento riportate da GRASSI nella sua opera «Stùdi di uno zoologo sulla malaria» del 1901. Le ricerche di ROUBAUD, benchè fossero da questi riferite in forma suggestiva e brillante, non eliminavano il dubbio che il riversarsi degli anofeli nelle stalle fosse dovuto al termotropismo di questi insetti. Mancava insomma la prova sperimentale decisiva dell'esistenza di una razza zoofila. Questa prova fu data da GRASSI.

Per dimostrare un reale cambiamento di gusto negli anofeli che avrebbe condotto alla differenziazione di una razza zoofila, GRASSI comprese che era necessario tenere in osservazione, ad esempio una stalla di animali e una stanza da letto contigua, dove dormissero parecchi individui e in cui la temperatura raggiungesse o superasse quella della stalla. Soltanto nel caso che questa e simili prove avessero dato una spiccata differenza nella scelta del cibo da parte degli anofeli nuovi arrivati, si sarebbe potuto asserire che veramente esisteva una razza di anofeli che preferiva gli animali all'uomo. Per raggiungere questa prova sperimentale, nel giugno e nel luglio 1921, GRASSI si recò più volte a Schito. La quantità di anofeli che qui pullulava era veramente enorme: con tutto ciò, la malaria da molti anni era assente. Nessun nuovo focolaio avevano sollevato i militari malarici ritornati nella zona, reduci dalla guerra. Nei suoi viaggi a Schito il Maestro fu spesso accompagnato dal Dott. WEISS, medico condotto di Fiumicino, da JUCCI, SILVESTRI; sempre ebbe con Lui il fedele NERI. GRASSI e NERI pernottarono più volte nelle camere da letto delle abitazioni di Schito, senza che potessero sorprendere mai un solo anofele che pungesse o tentasse di pungere l'uomo. L'osservazione che a Schito la temperatura, in estate, si manteneva abbastanza alta, all'aperto, anche la notte, gli permise di escludere che il riversarsi degli anofeli nelle stalle fosse dovuto ad una semplice azione termotropica. Mi sia permesso di ricordare con le stesse parole di GRASSI l'ultimo di questi suoi esperimenti compiuto nella notte fra il 19 e 20 luglio del 1921, in una povera casa di contadini. Questo esperimento, che fu il decisivo, dimostra ancora una volta come il grande Biologo fosse sempre dominato dall'ansia di eliminare qualsiasi dubbio che potesse adombrare la ve-

rità e come per raggiungere questo non rifuggisse da alcuna fatica, da alcun disagio. Ecco come Egli descrisse questo suo esperimento: «... la notte dal 19 al 20 luglio fu da me e da Neri passata in una camera al primo piano gentilmente concessami da una buona famiglia di ortolani... Nel letto matrimoniale stava coricato in mezzo il contadino, da un lato il Neri e dall'altro io, tutti e tre con le braccia scoperte, io e Neri anche con le gambe scoperte: su un paio di sedie dormiva un ragazzino del pari con gli arti nudi. Appena cominciò a fare scuro, si accese una lampada ad acetilene con il riflettore, che lasciava una gran parte della camera all'oscuro. La finestra e le due porte erano spalancate: le rane gracidavano nelle acque impaludate a pochi metri di distanza: i porcili contigui alla abitazione erano pieni, zeppi di anofeli... Dal tramonto sino alle sei del mattino si vigilò. Io non dormii mai: solo per pochi istanti chiuse gli occhi il Neri varie volte da mezzanotte alle tre: il resto della notte fu anch'egli sempre sull'attenti. A brevi intervalli ci alzavamo e alla luce della lampada esaminavamo il contadino e suo figlio. *Nessun anofele punse, nessun anofele ci si avvicinò*... Si tenga presente che la nottata fu molto calda: l'aria era immobile, non tremava uno stelo: l'afa opprimeva: condizioni più favorevoli per gli anofeli non potrebbero immaginarsi». E così, alla fine della notte insonne, trascorsa in una povera stanza di contadini, nell'afa soffocante e non certo in un comodo letto, Egli ebbe un'ulteriore, irrefragabile prova di ciò che, si può dire, aveva già da prima accertato: che gli anofeli di Schito spontaneamente non pungono l'uomo e anzi rifuggono dal pungerlo. Esiste dunque — Egli affermò — una razza biologica di anofeli, la quale non punge l'uomo. Con la consueta lealtà, Grassi, pur avocando a sè il merito della scoperta, non disconobbe i meriti degli altri, come risulta da queste parole tolte da un suo scritto: «... al Bonservizi si deve la ingegnosa proposta della protezione animale come lotta antimalarica; al Roubaud si deve il merito di aver messo innanzi per la prima volta il concetto di un compito speciale assunto dal bestiame o in altre parole della possibilità che esista una razza speciale di anofeli che ha cambiato gusto e che è diventata zoofila. Infine la dimostrazione dell'esistenza di questa razza, che non risulta dalle osservazioni del Roubaud, è stata invece data da me...».

La dimostrazione dell'esistenza di una razza anofelica misantropa data da Grassi gettò una nuova luce sul fenomeno dell'anofelismo senza malaria di alcune località.

Trasportata nel campo pratico, la scoperta dell'esistenza di una razza biologica di *maculipennis* che non punge l'uomo, faceva apparire al Grassi più che mai complicata anzichè risolta la questione delle zooprofilassi, cioè la difesa dell'uomo mediante il bestiame che attira gli anofeli. Grassi non disconobbe l'importanza della zooprofilassi, come qualcuno ha erroneamente creduto: lo dimostra l'ampio contributo di osservazioni e di ricerche da Lui portato alla questione e l'essersi dimostrato in accordo con Sella, quando questi nel

1919 a Fiumicino, aveva fatto la proposta di proteggere l'abitato con una cintura di porcili attiranti gli anofeli. In realtà, Egli riteneva la soluzione del problema malarico con la zooprofilassi ancora lontana, perchè le questioni che si presentavano al suo spirito di profondo indagatore e di acuto critico gli facevano apparire il problema di una complessità che altri non vedeva. La zooprofilassi, Egli pensava, non poteva attuarsi, se non compiendo prima estese ricerche sulla biologia degli anofeli, specialmente sulla variabilità dei loro gusti e delle loro preferenze alimentari, variabilità che Egli aveva osservato nelle diverse località. Aveva infatti constatato nel 1922 che in provincia di Verona, l'*A. maculipennis* pungeva moltissimo gli animali domestici, ma rispettava l'uomo, mentre contemporaneamente, in provincia di Padova pungeva molto anche l'uomo e sembrava preferirlo agli animali.

E' evidente che Egli si era imbattuto, nelle sue peregrinazioni nelle diverse località, in razze diverse di *A. maculipennis,* in quelle razze la cui esistenza doveva essere dimostrata dopo la sua morte. Riesce difficile pensare che Egli non sarebbe giunto a questa dimostrazione se la morte avesse tardato ancora un poco ad interrompere la sua fatica. Aveva trovato la via: l'avrebbe percorsa sino in fondo, sino alla scoperta della verità completa, come aveva fatto per tanti altri problemi, forse ancora più complessi. Il buon seme fu però raccolto. Nel 1926, FALLERONI, com'è noto, richiamava l'attenzione sul fatto che i *maculipennis* delle Paludi Pontine deponevano uova di diverso tipo ed avanzava l'ipotesi che a questi diversi tipi di uova corrispondessero razze diverse della specie in questione. Quest'argomento ripreso dal ROUBAUD in Francia, da VAN THIEL, SWELLENGREBEL e DE BUCK in Olanda, da MARTINI in Germania, da MISSIROLI, HACKETT e collaboratori in Italia, doveva portare, come si sa, alla conclusione che la specie *maculipennis* non è omogenea, ma comprende un insieme di specie e di varietà distinguibili per i caratteri delle uova e, ciò che più importa, per i loro caratteri biologici, sopratutto per le diverse abitudini alimentari, donde la loro diversa capacità di trasmettere la malaria. Senza dubbio quella forma di *maculipennis,* che venne indicata comunemente col nome di *typicus,* caratterizzata biologicamente da una vera ripugnanza per il sangue umano e predominante nelle località di anofelismo senza malaria, corrisponde alla razza misantropa di GRASSI. Sia reso perciò onore ai valenti studiosi che ho nominato e ai molti altri che a loro seguirono: le loro indagini contribuirono molto, senza dubbio, al progresso delle conoscenze sulla epidemiologia della malaria e a gettare nuove basi per la lotta antimalarica, ma non si può fare a meno di riconoscere che la luce che li illuminò venne, forse senza che essi se ne rendessero conto pienamente, da Colui che da qualche anno dormiva il suo sonno eterno nel cimitero di Fiumicino.

Negli ultimi anni della sua vita, GRASSI, affranto nel fisico ma sempre vigile nello spirito e sempre teso nell'ansia di sapere, volle intraprendere la revisione degli anofeli italiani dal punto di vista morfologico e biologico e ri-

solvere la questione dell'esistenza di più razze nella specie *Culex pipiens*, aiutato da una sua collaboratrice che continuò queste ricerche, dopo la sua morte, secondo le direttive da Lui tracciate. Particolare interesse destava in Lui quell'*Anophelus elutus* (o *sacharowi*) che doveva risultare, più tardi, essere la forma del gruppo *maculipennis* che presenta il maggior grado di associazione con l'uomo ed è quindi la più pericolosa dal punto di vista della trasmissione della malaria.

Il suo ultimo studio, quello sull'*Anopheles superpictus,* lo condusse alla scoperta che le uova di questa specie non presentano le note camere d'aria che sono caratteristiche in genere degli anofeli. Questo fatto fece affiorare in Lui le antiche amarezze procurategli da Ross e lo spinse ad un ultimo spunto polemico. « Ross aveva preteso — Egli scrisse — che io fossi arrivato ad accusare gli anofeli come propagatori della malaria umana, basandomi sulla sua asserzione di avere trovato stadi di sviluppo dei parassiti malarici in certi mosquitos con le ali macchiate e con le uova fornite di camere d'aria. Se io avessi seguito la descrizione data da Ross di questi mosquitos, avrei cercato una forma con quattro macchie al margine anteriore dell'ala e avrei trovato il *superpictus* che presenta proprio tale carattere, ma rilevando poi la mancanza delle camere d'aria avrei dovuto rinunciare a qualsiasi identificazione e concludere che non era possibile orientarsi con i dati del Ross ... La verità è che io sono arrivato agli Anofeli trasmettitori della malaria umana indipendentemente dal Ross ». Questo fu il suo ultimo grido. La sua vita si concluse, infatti, con la pubblicazione delle sue ultime ricerche sull'*Anopheles superpictus*, scritto che non si può rileggere senza essere pervasi da commozione profonda. Dettate, raccogliendo le forze estreme, alla figlia Isabella alcune correzioni da introdurre nelle bozze di stampa, Egli chiuse poche ore dopo la sua vita unicamente dedicata alla Scienza ed al suo Paese di cui Egli dimostrò di essere uno dei figli più illustri e devoti non con la vana parola ma con l'esempio mirabile ed imperituro delle sue opere.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

LE VIE DELLO SVILUPPO DELLA SCIENZA E DELLA PRATICA ELMINTOLOGICA NELL'URSS

DIMITRI N. ANTIPIN (*)

Il mondo dei vermi parassiti è singolarmente grande e variato. Esso abbraccia quattro tipi del regno animale: *Nemathelmintes*, *Plathelmintes*, *Acanthocephales* ed *Annelides* e conta più di diecimila specie.

Dato il modo di vivere parassitario di questo grande gruppo di animali, il suo studio richiede una trattazione specifica. Il parassitismo lascia la sua impronta sulla morfologia, anatomia e fisiologia degli elminti. Ciò obbliga a studiare tutte le complesse e delicate correlazioni fra l'elminto e l'ospite, così come fra l'elminto e l'ambiente esterno, nella più vasta concezione della parola. Poichè non esistono in natura elminti innocui, ne sorge un vasto circolo di problemi, collegati coll'influenza patogena degli elminti sull'organismo umano e degli animali e piante, ed anche l'elaborazione delle misure di lotta contro le malattie provocate dagli elminti.

Tutta questa varietà di problemi, che richiedono un profondo studio scientifico e che hanno nello stesso tempo un grande significato teorico-conoscitivo ed economico-nazionale, impone l'obbligo di considerare l'elmintologia come scienza indipendente con metodi specifici di ricerca.

Malgrado il significato scientifico-pratico di questa scienza, essa non esisteva nella Russia prerivoluzionaria, così come non esistevano specialisti elmintologi.

In quel periodo un'insieme relativamente piccolo di problemi è stato studiato principalmente da zoologi e naturalisti, ed anche in parte da medici e veterinari. Scienziati quali N. A. KHOLODCOVSKI, V. O. CLER, S. N. CAMENSKI, M. I. ROMANOVITCH ed altri hanno lasciato un profondo vestigio nella storia dello sviluppo dell'elmintologia nel periodo prerivoluzionario.

Però l'elmintologia, come scienza, è stata formata solamente durante l'epoca sovietica. Essendo profondamente interessato nella protezione della salute dei lavoratori, come anche nello sviluppo rapido della zootecnia, il Governo Sovietico ha concesso le più vaste possibilità per lo sviluppo della

---

(*) *Istituto di Elmintologia « C. I. Scrjabin ». Mosca.*

scienza e pratica elmintologica. Un ruolo importante nello sviluppo di questa scienza appartiene allo scienziato eminentissimo dell'Unione Sovietica, l'accademico C. I. Scrjabin. Dal principio della costituzione del potere sovietico egli si è messo a capo dell'edificazione della scienza e pratica elmintologica, e continua tuttora nella direzione di questo ramo scientifico. Negli anni del potere sovietico, nell'URSS è stata costruita una rete d'istituzioni elmintologiche che nella sua parte biologica è diretta dal laboratorio della sezione di Biologia dell'Accademia delle Scienze dell'URSS e nella parte veterinaria dall'Istituto « C. I. Scrjabin » d'Elmintologia dell'Unione. Nella parte medica è diretta dall'Istituto di malaria, parassitologia ed elmintologia medica.

Oltre l'Istituto d'Elmintologia, il lavoro scientifico si realizza in 10 Istituti di ricerche scientifiche ed anche in 29 stazioni sperimentali veterinarie di ricerche scientifiche, come anche in tutte le cattedre di parassitologia delle scuole veterinarie superiori. Parecchie istituzioni biologiche svolgono dei temi elmintologici di interesse veterinario.

La scienza elmintologica abbraccia un grande esercito di lavoratori della scienza, uniti nella Società elmintologica dell'Unione, presso la sezione biologica dell'Accademia delle Scienze dell'URSS, che conta presso a poco 800 Soci.

La scienza elmintologica nell'URSS si è sviluppata secondo un piano determinato, parallelamente e simultaneamente colla pratica elmintologica. I successi elmintologici erano subito posti in pratica. A sua volta la pratica arricchiva di esperienza la scienza e proponeva piani di ricerca per i problemi più urgenti che richiedevano uno studio scientifico. Una tale unione della scienza colla pratica ha assicurato uno sviluppo straordinariamente rapido sia della scienza, che della pratica.

La prima grande tappa nello sviluppo della elmintologia in generale, e dell'elmintologia veterinaria in particolare, è stata la rilevazione della elmintofauna degli animali domestici e selvaggi, realizzata mediante l'autopsia e l'esame durante la vita degli animali. Per l'autopsia degli animali è stato largamente utilizzato il metodo delle autopsie complete elmintologiche, secondo Scrjabin. Questo metodo permette di tener conto nel modo più completo possibile della elmintofauna dell'oggetto osservato, di stabilire la composizione qualitativa e quantitativa degli elminti che invadono gli animali e di determinare con precisione la localizzazione di queste o quelle specie di elminti nell'organismo dell'animale. Mediante tale metodo sono state esaminate assolutamente tutte le specie di animali domestici in tutte le zone climaticamente tipiche della Unione Sovietica: dalla Ciucotca ad oriente, fino alla frontiera dello Stato ad occidente; dalla Terra Nuova al nord fino alle repubbliche dell'Asia Centrale e del Transcaucaso al sud.

Col metodo delle autopsie elmintologiche complete sono stati esaminati all'incirca 100.000 rappresentanti del regno animale, e tra essi diecine di migliaia di animali domestici. Questo metodo diede la possibilità di fare una vera

rilevazione completa della composizione qualitativa degli elminti che invadono gli animali domestici. Per illustrarlo citiamo le cifre seguenti:

Nelle pecore e capre sul territorio dell'Unione Sovietica sono state registrate 82 specie di elminti, e fra queste furono scoperte 30 specie nuove.

Nei bovini: 64 specie, fra le quali 8 nuove.

Nei cavalli: 95 specie, fra le quali 6 nuove.

Nei porci: 32 specie, fra le quali 5 nuove.

Nei cammelli: 40 specie, fra le quali 3 nuove.

Nelle renne: 32 specie, fra le quali 16 nuove.

Nei conigli: 11 specie, fra le quali 1 nuova.

Nei cani: 56 specie, fra le quali 11 nuove.

Nei gatti: 49 specie, fra le quali 6 nuove.

Nei polli e tacchini: 70 specie, fra le quali 20 nuove.

Nelle anitre domestiche: 80 specie, fra le quali 22 nuove.

Nelle oche domestiche: 51 specie, fra le quali 4 nuove.

L'esame degli animali domestici col metodo delle autopsie elmintologiche complete ha dato la possibilità non solo di rilevare la composizione quantitativa degli elminti, ma anche di stabilirne la distribuzione geografica, di rilevare i focolai delle elmintiasi più pericolose, che sovente provocano la morte fra gli animali domestici. Alla rilevazione dei focolai delle elmintiasi ha anche contribuito l'esame in massa degli animali durante la vita, coi metodi di ricerca elmintoscopica, ovoscopica e larvoscopica. Col metodo di ricerca durante la vita vengono esaminati annualmente milioni di capi di animali domestici.

La conoscenza delle zone di distribuzione delle elmintiasi permette di pianificare con precisione i provvedimenti antielmintici e di aspettarne risultati efficaci.

La seconda tappa essenziale nello sviluppo della elmintologia è lo studio delle elmintiasi e l'elaborazione dei metodi di lotta contro di esse. Questa parte del lavoro è stata eseguita seguendo la linea dello studio della diagnostica delle elmintiasi, della identificazione dei cicli di sviluppo degli agenti patogeni dello studio della patogenesi ed anatomia patologica nelle elmintiasi, della clinica, immunità, epidemiologia, terapia e profilassi di queste infermità.

La diagnostica delle elmintiasi si realizza in sostanza coi metodi di ricerca elmintologica che impostano il problema dello stabilimento del fatto di presenza dell'agente patogeno nell'organismo dell'animale infermo. Con questo scopo sono elaborati e raccomandati alla pratica diversi metodi di diagnostica durante la vita, compreso il metodo di elmintoscopia, i metodi di flottazione per l'elmintovoscopia, basati sulla differenza tra il peso specifico delle uova e quello di soluzioni saline, e dei metodi di ricerche larvoscopiche.

Ai fini diagnostici si utilizza in una serie di casi la così detta « deelmintazione diagnostica », cioè il trattamento dell'animale e la rilevazione successiva degli elminti o dei suoi frammenti.

Mediante una serie di lavori di ricerca scientifica è stata dimostrata la possibilità di diagnosticare le elmintiasi per mezzo dell'applicazione delle reazioni immuno-biologiche. Questi metodi però non hanno per ora trovato un'applicazione pratica.

Lo studio dei cicli di sviluppo degli elminti. Poichè la conoscenza della biologia degli elminti facilita l'organizzazione della lotta contro le elmintiasi degli animali di interesse agricolo, a questo indirizzo di lavoro si è prestato e si presta una grande attenzione. E' stato studiato il ciclo dello sviluppo di quasi tutti gli elminti che provocano malattie, con corso sotto forma di enzoozie chiaramente manifeste.La biologia di parecchi bioelminti è stata per la prima volta illustrata dagli elmintologi sovietici. In particolare, il ciclo dello sviluppo degli agenti della telaziosi nei bovini è stato rivelato nel 1948-49 dagli scienziati sovietici. Gli ospiti intermedi per la *Thelazia rhodesi,* sono stati stabiliti come segue: per l'Estremo Oriente *Musca convexifrons,* per l'Ucraina *Musca larvipara* e *Musca autumnalis.* Per le specie *Th. gulosa* e *Th. Skrjabini* l'ospite intermedio nell'Estremo Oriente è la *Musca amica,* mentre l'ospite intermedio per *Th. gulosa* nell'Ucraina è stato stabilito nella *Musca larvipara.* Il ciclo dello sviluppo dell'agente della skrjabinotrematosi delle pecore è stato pure studiato dagli scienziati sovietici dettagliatamente. Con ciò fu chiarito che questo ciclo si svolge colla partecipazione di un ospite intermedio, il mollusco *Macrochlamys Kasachstani* e di un'ospite complementare rappresentato da 7 specie di molluschi.

Per la prima volta è stato osservato il ciclo di sviluppo dell'agente della polimorfosi delle anitre — *Polymorphus magnus* — il cui ospite intermedio è *Gammarus lacustris,* e così pure il ciclo di sviluppo dell'agente della plagiorcosi delle galline — *Plagiorchis arcuatus* —. Come ospiti intermedi di quest'elminto sono risultati i molluschi (primo ospite intermedio) e le larve e l'imago delle libellule (secondo ospite intermedio). E' stato anche stabilito sperimentalmente che il ciclo dell'agente della streptocarosi delle anitre — *Streptocara crassicauda* — si svolge con l'aiuto di *Gammarus lacustris.*

E' stato identificato il ciclo di sviluppo degli agenti delle anoplocefalidosi dei cavalli e quello delle moniezie che parassitano le pecore, le capre e i bovini. E' stato pure stabilito il ciclo di sviluppo del parassita dei cani — *Multiceps skrjabini* — e molti altri.

Ordinariamente lo studio del ciclo biologico dei bioelminti è stato accompagnato dalla rilevazione di tutti gli stadi di sviluppo dell'elminto negli ospiti intermedio e definitivo.

Sono state stabilite le modalità dello sviluppo delle larve nell'ospite intermedio fino al raggiungimento dello stadio infestante, ed anche le modalità dello sviluppo dell'elminto nell'organismo dell'ospite definitivo, dal momento della ingestione delle larve fino al raggiungimento dello stadio adulto.

E' stata inoltre chiarita e studiata la biologia e l'ecologia degli ospiti

intermedi per la loro utilizzazione nella impostazione di provvedimenti profilattici.

Collo scopo di chiarire la biologia degli agenti delle elmintiasi che si riferiscono al gruppo dei geoelminti, sono stati realizzati lavori importanti. In particolare è stato studiato dettagliatamente il ciclo di sviluppo degli agenti della dictiocaulosi nelle pecore e vitelli, ed anche parzialmente nei cavalli. Sono stati pure studiati gli agenti dell'ascaridosi nei maiali, della parascaridosi nei cavalli, della ascaridosi nelle galline, della emoncosi nelle pecore, della delafondiosi, alfortiosi e strongilosi nei cavalli, della strongiloidosi, globocefalosi e chiostrongilosi nei maiali e parecchi altri.

Questi dati, in combinazione colle osservazioni epidemiologiche, sono stati messi a base della lotta contro le elmintiasi degli animali domestici.

Epidemiologia delle elmintiasi. Questo, in sostanza, è un nuovo orientamento nella scienza elmintologica che comprende dati molto importanti per l'organizzazione della lotta contro le elmintiasi. Ad essa si riferiscono lo studio della diffusione delle elmintiasi, la rilevazione delle vie e fonti di contagio degli animali, il chiarimento del comportamento degli stadi infestanti (uova e larve) nell'ambiente esterno e le loro relazioni con i fattori ambientali — temperatura, umidità, carattere delle condizioni del suolo, ecc.

Nell'URSS queste ricerche si sono sviluppate su vasta scala poichè, grazie alla grande varietà delle condizioni climatico-geografiche, l'andamento delle elmintiasi nelle varie zone dell'Unione Sovietica è diverso, e perciò la lotta contro esse non può essere la stessa. Per conseguenza lo studio della epidemiologia regionale delle elmintiasi è da noi una premessa obbligatoria per l'organizzazione dei provvedimenti sanitari.

La conoscenza esatta della diffusione delle elmintiasi e il chiarimento delle cause della loro presenza od assenza in uno o nell'altro centro abitato, rappresenta la base per creare le necessarie condizioni che permettano la prevenzione dell'apparizione e diffusione elmintiasi.

La fissazione dei termini mensili dello sviluppo delle uova o larve prima dello stadio infestante nell'ambiente esterno, e la contemporanea rilevazione di dati precisi su conservazione della loro vitalità nelle condizioni di pastura, permette di organizzare la profilassi contro il contagio, e nello stesso tempo di raggiungere la sterilizzazione biologica delle pasture nei riguardi di una serie di elminti, mediante lo scambio regolare del terreno di pascolo.

Il chiarimento del problema concernente l'andamento dell'invasione ha un significato essenziale.

Ogni elmintiasi ha il suo andamento specifico nel tempo, il periodo d'apparizione ed incremento della invasione, il periodo della sua più elevata propagazione ed il periodo del regresso naturale.

La rilevazione della regolarità nell'andamento delle elmintiasi si realizza per mezzo dell'ispezione mensile dello stesso gruppo di animali ed autopsie

mensili di animali da macello, tenendo conto della temperatura e delle precipitazioni atmosferiche durante il periodo d'ispezione.

Per la lotta contro le elmintiasi è pure importante di chiarire le vie e le fonti di contagio degli animali.

Com'è noto in natura esistono focolai, da cui hanno origine le invasioni, la cui rilevazione e conseguente distruzione contribuirà certamente alla soppressione delle elmintiasi.

Finalmente, il chiarimento della biologia ed ecologia degli ospiti intermedi, e complementari è una delle parti principali dell'epidemiologia delle bioelmintiasi.

La deelmintazione riunisce in sè due atti molto essenziali: il primo consiste nella liberazione dell'animale dagli elminti per mezzo degli antielmintici; il secondo nella creazione di condizioni tali che gli elementi sessuali dei vermi parassiti, prodotti durante il trattamento, non servano di fonte di contagio degli animali domestici. In altri termini, la deelmintazione d'ogni animale deve combinare l'effetto curativo col profilattico.

La scienza elmintologica sovietica attribuisce alla deelmintazione un ruolo prevalente nella lotta contro le elmintiasi degli animali domestici, e perciò la ricerca di nuovi mezzi antielmintici ed il perfezionamento dei vecchi occupa un posto eminente nei piani delle istituzioni di ricerca scientifica.

Un'attenzione particolare si deve prestare alla deelmintazione cosidetta preimmaginale che assicura un grande effetto profilattico. In questo caso il trattamento degli animali si realizza quando gli elminti non hanno ancora raggiunto lo stadio adulto. L'allontanamento di tali elminti esclude la propagazione dell'infestazione in natura e protegge gli animali da una malattia prolungata.

Nell'URSS si eseguono in grande scala le deelmintazioni preimmaginali nel caso della monieziosi delle pecore; altre se ne vanno elaborando in riguardo alle altre elmintiasi.

Le deelmintazioni presentano un'effetto incomparabilmente maggiore se sono realizzate a tempo opportuno; risultati assai diversi saranno infatti ottenuti a seconda se la deelmintazione sia fatta nel momento dell'incremento dell'invasione o in quello del suo decremento naturale.

La lotta contro le elmintiasi degli animali agricoli è formata d'una serie di momenti. Essa anzitutto deve avere un carattere pianificato. Nel piano deve essere tenuto conto se si prevedano misure per la lotta contro una ovvero diverse elmintiasi. In esso vengono indicati dettagliatamente i provvedimenti da realizzare, i termini della realizzazione e le persone incaricate di eseguirle. Questo piano è poi approvato dalla direzione rispettiva: nella scala rurale dall'amministrazione rurale, nella scala regionale dall'amministrazione regionale, e così via. Si deve anzitutto far conoscere dettagliatamente il piano

ai suoi esecutori, e poi ai proprietari degli animali oppure alle persone che li governano.

I provvedimenti sanitari possono perseguire scopi diversi: la cessazione dell'epizoozia e dell'infermità degli animali, oppure un annientamento completo delle elmintiasi. Nel primo caso i provvedimenti si realizzano solamente nelle economie poco prospere. Nel secondo caso questi provvedimenti già abbracciano dei grandi territori secondo gli indizi climatico-geografici.

In entrambi casi, in primo luogo si raccomanda di cominciare dal miglioramento delle condizioni dell'alimentazione, manutenzione e governo degli animali. A nostro parere, questo sarebbe il provvedimento fondamentale della lotta contro qualunque elmintiasi. E' un provvedimento fondamentale, però non è l'unico. Inoltre si deve osservare tutta una serie di condizioni.

I provvedimenti abbracciano tutti i capi del bestiame, suscettibili ad una certa infermità. Così per esempio, non si devono limitare i provvedimenti in riguardo alla fasciolosi delle pecore, ma si debbono pure estendere alla fasciolosi dei bovini ed altri animali suscettibili.

Se è posta la questione dell'annientamento dell'una o dell'altra malattia, tutti i portatori della data infestazione, senza eccezione, devono essere immancabilmente sottoposti alla deelmintazione.

L'esecuzione di tutti i provvedimenti si realizza esattamente nei termini, indicati nel piano, e simultaneamente dev'essere organizzato il computo dei provvedimenti realizzati, come anche il controllo della sua esecuzione.

Nella lotta contro le elmintiasi degli animali domestici, i provvedimenti specifici sono in sostanza formati dai momenti seguenti:

1 - La rilevazione della consistenza degli animali nel territorio indicato per il risanamento e l'acquisto della necessaria riserva di antielmintici e di altre attrezzature.

2) - La rilevazione della situazione elmintiasica della zona risanata. Per questo scopo si procede all'ispezione degli animali ed all'analisi della relazione veterinaria in riguardo alle elmintiasi.

3) - La realizzazione delle deelmintazioni profilattiche nei termini indicati nel piano.

4) - L'organizzazione di provvedimenti profilattici, composti di:

a) - gli scambi dei terreni di pascolo nel periodo di pastura, tenendo conto del periodo necessario perchè le uova o le larve raggiungano lo stadio infestante: nella fasciolosi dopo due mesi, due mesi e mezzo, nella dicroceliosi delle pecore dopo due mesi e mezzo, nella emoncosi e dictiocaulosi delle pecore dopo 6-12 giorni, e così via.

b) - l'organizzazione del mantenimento e del pascolo separato dagli altri gruppi d'età maggiore, dei vitelli, nati nell'anno in corso, allo scopo di profilassi dal contagio di dictiocaulosi.

c) - l'organizzazione di abbeveratoi igienici escludenti la possibilità del contagio degli animali dalle elmintiasi assieme al beveraggio.

d) - l'organizzazione dell'innocuità del concime mediante la sua custodia nei depositi di concimi, oppure in mucchi posti su campi piani, cinti e circondati con un fossatello.

5) - Una realizzazione precisa del controllo veterinario-sanitario sulla macellazione della carne.

6) - L'annientamento dei cani randagi, il computo e la deelmintazione dei cani utili all'economia.

RIASSUNTO

Vengono riferiti i risultati raggiunti nel campo dell'elmintologia, ed un particolare dell'elmintologia veterinaria, nell'U.R.S.S. Sono illustrate nei dettagli le vie seguite per lo studio degli elminti e per la lotta contro di essi.

SUMMARY

The autor reports the results achieved in the field of elminthology, and particularly of veterinary elminthology, in the U.R.S.S. A full account is given of the lines followed for the study of helminths and for their control.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

THE ORIGIN OF RURAL PUBLIC HEALTH

With Particular Reference To The United States

DONALD L. AUGUSTINE (*)

Modern public health is the product of a slow evolutionary process in which mankind constantly sought means of protection against disease. The great sanitary reforms of the 18th and 19th centuries were basic steps forward, with the view to improve the health and comfort of the city dweller and to protect the city from epidemic disease. They were not concurrently related to the development of rural public health. Refuse removal from city streets and houses was early recognized as an important measure toward the prevention of epidemic disease. The dung heap on the farm, however, was but a valuable source of crop fertilizer for the personal use of the farmer and unrelated in any way to community health. Later developments following the advent of bacteriology, food sanitation, methods for tracing epidemics, laboratory diagnosis, the preparation of vaccines and vaccine therapy were, to a large degree, developments of bacteriological laboratories within city health departments and were primarily employed for use within the city. The countryside, even in medieval times, was considered essentially healthy. It was a refuge for city dwellers in times of pestilence.

Probably the earliest and most compelling cry for organized rural public health was heard November 24, 1899. That day, BAILEY K. ASHFORD[1] announced by telegram he had proven that much of the anemias rampant in the rural districts of Puerto Rico was due to hookworm infection. Slighty more than four years later, February 16, 1904, a bill calling for the formation of a commission for the study and treatment of hookworm disease in Puerto Rico was passed with an appropriation of funds. An active, systematic campaign of diagnosis, treatment, prevention and control was begun against a disease peculiar to rural people.

(*) *Professor of Tropical Public Health Harvard University, School of Public Health.*

In the immediate years that followed Dr. ASHFORD's discovery of hookworm disease in Puerto Rico it became apparent that the disease was widespread throughout the rural sections of southern United States. In 1909 the Florida State Department of Health instituted a campaign against hookworm disease with field operations in three different areas. Also, somewhat later in that year, the Rockefeller Sanitary Commission was created « for the purpose of eradicating hookworm disease ». In 1915 the work of the commission was merged with that of the International Health Board of the Rockefeller Foundation, founded in 1913, which agency continued and extended the hookworm control work in the Southern States and to rural sections of countries throughout the tropical world.

Hookworm disease was not a new discovery when ASHFORD attributed anemia in Puerto Rico to be due to hookworm infection. Hookworms were first recognized in man in 1838 by ANGELO DUBINI[2] in Milan, Italy. Within ten years it was established that hookworm disease was widespread throughout the tropics. BATTISTA GRASSI and his co-workers, CORRADO and ERNESTO PARONA[3], demonstrated in 1878 that hookworm disease could be readily detected from eggs of the parasite in the patient's feces.

In 1879 CAMILLO BOZZOLO[4] introduced thymol as a vermifuge. It became the drug of choice for the treatment of hookorm disease for many years in the control campaigns. During the ensuing ten years the development of the free-living stages of the parasite were elucidated, and LOOSS[5], in 1898, discovered the dermal route of infection.

Thus, unlike the development of the modern city health department which had its origin in mysticism of the dark ages and in attempts to prevent and control epidemic diseases of unknown etiology in the socalled era of sanitary awakening, the official rural health unit began with an organized body of workers against an endemic disease of known etiology and established methods for diagnosis, treatment, prevention and control.

ALLEN W. FREEMAN[6] aptly stated in 1912, « The campaign against hookworm disease is but the forerunner of a larger fight-against diseases which we peculiarly suffer ». The installation and use of latrines at the farm homes simultaneously provided protection against typhoid fever and dysentery as well as against hookworm disease. FREEMAN[7] further added, « The progress in sanitation in the past five years is almost marvelous ».

Wider health services for the rural areas followed in the wake of the hookworm control campaigns as its benefits were realized. Thus, it can be said that the foundation of the modern county health unit in the United States, and rural public health throughout the tropical world, was laid when it was realized that hookworm disease was a reality and that it constituted a serious menace to rural health and prosperity.

SUMMARY

The modern city department of public health had its beginning in attempts to control epidemic and pandemic diseases of unknown etiology but believed to be of deistic and miasmatic origins. It is the product of a slow evolution. The official rural health unit in the United States began with an organized body of workers against an endemic disease of known etiology and established methods for diagnosic, treatment, prevention and control - namely, hookworm disease, a disease peculiar to rural people.

RIASSUNTO

Il dipartimento della Sanità Pubblica di una città moderna ebbe origine dai tentativi di lotta contro malattie epidemiche e pandemiche a eziologia sconosciuta ma ritenute di origine divina e miasmatica. Tale istituzione è il risultato di una lenta evoluzione.

L'unità ufficiale che controlla la salute pubblica nei centri rurali degli S. U. d'America iniziò con un nucleo organizzato da tecnici per combattere una malattia endemica a eziologia conosciuta instaurando metodi di diagnosi, cura, prevenzione e lotta: cioè l'anchilostomiasi, una affezione propria degli abitanti delle zone rurali.

BIBLIOGRAPHY

1. ASHFARD, BAILEY K. GUTIÉRREZ IGARAVIDEZ, PEDRO. (1911). Uncinariasis (hookworm disease) in Porto Rico: a Medical and Economic Problem. Wash., Govt. print off. 335 p. (*U. S. 61st cong., 3rd sess., sen. doc.* 808).
2. DUBINI, ANGELO. (1843) Nuovo verme intestinale umano (*Agchylostoma duodenale*) costituente un sesto genere dei nematoidei proprii dell'uomo. *Ann. univ. di med e chir. Milano, CVI*: 5-13, 2 pl.
3. GRASSI, BATTISTA, PARONA CORRADO & PARONA, ERNESTO. (1878) Intorno all'*Anchilostoma duodenale* (Dubini). *Gazz. med. ital. lomb. Milano*, 20, 193-196.
4. BOZZOLO, CAMILLO. (1879) L'anchilostomiasi e l'anemia che ne conseguita (anchilostomanemia) *Gior. internaz. d. sc. med.* Napoli, n. s. I. 1954-069, 1245-1253.
5. LOOSS, ARTHUR. (1905, 1911) The anatomy and life history of *Agchylostoma duodenale* Dub.: a monograph. Cairo, Nat. print. dept., 2 pts. *Egypt. Ministry of education, Records of the school of medicine, III, IV.*
6. FREEMAN, ALLEN W. (1912) Rural Sanitation. *So. med. jour., IV*: 869-874.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

QUELQUES CONSIDERATIONS SUR LA SPECIFICITE PARASITAIRE

JEAN G. BAER (*)

On sait que le problème de la spécificité parasitaire peut se présenter sous des aspects très différents suivant le groupe de parasites envisagés. C'est d'ailleurs compréhensible puisque la spécificité ressortit à des causes très variées, résultant des relations complexes qui existent entre le parasite et son hôte. Comme, d'autre part, l'hôte représente le biotope du parasite, le problème de la spécificité parasitaire peut être ramené à un cas particulier d'adaptation et, en dernière analyse, à un problème d'écologie (BAER, 1946; 1951). Il s'ensuivra donc que plus les conditions écologiques auxquelles est adapté le parasite seront spécialisées, d'autant plus marqué sera le degré de spécificité parasitaire.

Il est, en outre, évident que l'association étroite entre le parasite et son hôte ou groupe d'hôtes, exercera sur lui des effets analogues à ceux que provoque l'isolement d'une faune, soit écologiquement soi géographiquement, à savoir la spéciation, c'est-à-dire, l'apparition d'espèces caractéristiques pour le biotope.

Pareil phénomène est facile à concevoir dans tous les cas où le parasite passe son existence entière sur l'hôte, où il rencontre les conditions nécessaires à sa propre existence ainsi qu'à celle de ses formes larvaires. Sous ce rapport, les Mallophages illustrent clairement ce cas. On observe même que pour eux, la surface du corps de l'Oiseau ne représente pas un biotope uniforme, car aux conditions écologiques que représente le plumage de la tête et du cou, correspondent des genres et des espèces de Mallophages qui sont différents de ceux qui se rencontrent dans le biotope plumage des ailes.

Quoique les larves de Puces ne se rencontrent jamais sur l'hôte, elles vivent cependant dans le nid ou dans la tanière de ce dernier en sorte que les jeunes Puces atteignent, sans difficultés, le biotope qui leur assurera la nourriture indispensable pour se reproduire, à savoir, le sang de l'hôte.

L'effet de l'isolement de ces ectoparasites sur leurs hôtes a pour conséquence de favoriser l'apparition d'une très grande diversité morphologique tant à l'éche-

---

(*) *Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel.*

lon des genres qu'à celui des espèces. Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'isolement des ectoparasites sur leurs hôtes est maintenu grâce à des barrières éthologiques voire psychologiques qui s'opposent à une promiscuité aveugle des hôtes appartenant à des groupes différents. Chaque fois que ces barrières sont rompues et c'est le cas dans les jardins zoologiques, par exemple, on observe des « déserteurs » qui passent sur d'autres hôtes dont la présence peut masquer et même fausser le véritable aspect de la spécificité parasitaire. On connaît également quelques cas où de tels passages se sont effectués dans la nature.

En Angleterre, la Tadorne *Tadorna tadorna* qui niche, occasionnellement, dans les terriers de Lapins de garenne, héberge souvent la Puce caractéristique de ce dernier, à savoir *Spilopsylla cunicoli*, mais sans que celle-ci laisse voir la moindre transformation morphologique. Par contre, dans certaines îles au large des côtes continentales de l'Atlantique nord, les Puffins qui reviennent chaque année nicher dans les mêmes îles, hébergent une Puce, *Ornithopsylla laetitiae* qui paraît dérivée de la Puce de Lapin. D'autres cas analogues sont encore signalés dans l'ouvrage remarquable de Rothschild et Clay, (1952).

Il est donc possible de concevoir l'évolution ainsi que la spéciation des Puces et, sans doute également celle des Mallophages et des Poux, à partir de formes généralisées qui se seraient ensuite spécialisées par isolement sur leurs hôtes. On peut donc envisager une évolution parallèle entre les ectoparasites et leurs hôtes dont la conséquence serait de retrouver des relations phylogéniques éventuelles entre ces derniers par l'intermédiaire des premiers. De pareilles tentatives ont été faites par plusieurs auteurs dont nous ne citerons que le plus récents, à savoir Clay (1949, 1950). Nous reviendrons, plus loin, sur certaines de ses conclusions.

L'analyse des facteurs responsables de la spécificité parasitaire chez les helminthes fait immédiatement ressortir que, chez ceux-ci, les faits sont considérablement compliqués par l'existence de cycles évolutifs nécessitant un ou deux hôtes intermédiaires. Autrement dit, qu'à un moment donné de son existence, l'intimité entre le parasite et l'hôte définitif ne s'est pas encore formée. Il est donc clair que le cycle évolutif d'un helminthe ne pourra se boucler normalement que s'il existe entre l'hôte définitif et le, ou les, hôtes intermédiaires, une relation de nature écologique assurant à l'hôte définitif la possibilité de manger l'hôte intermédiaire qui renferme la forme larvaire infestante. La fécondité très élevée de la majorité des helminthes entoparasites apparaît donc comme la conséquence d'un mécanisme sélectif qui garantit la survie de l'espèce parasite.

Nous avons insisté, ailleurs (1951), sur l'importance des associations écologiques entre hôtes définitifs et hôtes intermédiaires, pour comprendre la nature, parfois paradoxale, de la spécificité parasitaire chez les Trématodes et nous n'y reviendrons pas. Il suffit de rappeler, toutefois, que l'on rencontre un degré élevé de spécificité du miracidium à l'égard des Mollusques, premiers hôtes inter-

médiaires, dont l'organisme assurera la multiplication des formes larvaires libres (cercaires). Les métacercaires atteignent rapidement et sans métamorphoses ultérieures, leur maturité sexuelle, aussi les conditions dans lesquelles celle-ci apparît semblent moins spécialisées que ce n'est le cas chez les Cestodes, par exemple. Il s'ensuit que la spécificité parasitaire des Trématodes s'observe aux trois stades principaux de leur évolution, mais qu' elle est le plus marquée au premier stade, chez le Mollusque, où elle pourrait bien être de nature essentiellement biochimique tandis qu'aux deux stades subséquents, la spécificité parasitaire ressortit presque uniquement à des facteurs écologiques.

On constate qu'il existe chez les Cestodes également, une relation écologique entre l'hôte définitif et le, ou les, hôtes intermédiaires en l'absence de laquelle le cycle évolutif ne pourrait se dérouler normalement. On observe d'autre part, tant par des recherches statistiques, qu'expérimentales, effectuées sur les ténias des Oiseaux, que chaque groupe d'Oiseaux renferme ses espèces propres qui sont distinctes de celles des autres groupes. La larve de Cestode, parvenue dans l'intestin d'un hôte, autre que son hôte ou groupe d'hôte normal, y rencontre une barrière biochimique qui empéche son développement ultérieur en Ver adulte. Il s'ensuit un degré très élevé de spécificité parasitaire chez les Cestodes en général et chez ceux parasites des Oiseaux en particulier. On trouve, en outre, des indications très nettes d'une évolution parallèle des Cestodes et de leurs hôtes qui justifie les tentatives faites jusqu'ici en vue d'établir des affinités éventuelles entre les hôtes par l'étude de leurs Cestodes (Baer, 1948).

Des recherches de ce genre sont nécessairement subordonnées à l'existence de caractères morphologiques primitifs dont l'évolution peut être suivie à travers les espèces d'un genre déterminé. Cependant, en règle générale, l'organisation hautement spécialisée d'un ténia ne permet pas de distinguer ce qui pourrait être un caractère morphologique primitif, d'un caractère évolué. Toutefois, au cours d'une récente révision taxinomique de la famille des *Tetrabothriidae* (Baer, 1954) nous avons trouvé que dans le genre *Tetrabothrius*, la structure de l'atrium génital permet de reconnaître une évolution suivant trois directions distinctes à partir d'un type généralisé que nous considérons comme primitif.

Les hôtes des *Tetrabothriidae* sont des Oiseaux de haute mer appartenant aux ordres des Sphénisciformes, Procellariiformes, Pélécaniformes, Gaviiformes, *Lari* et *Alcae*. Nous avons pu ainsi établir sur la base de la structure de l'atrium génital et à l'intérieur de chaque groupe d'hôtes, l'évolution des espéces et constater que celle-ci ne présente ni le même caractère ni la même diversité chez les différents groupes d'hôtes. Il ne nous est pas possible d'entrer ici, dans le détail de ces recherches pour lesquelles nous renvoyons au mémoire original, il nous est toutefois possible de faire état des conclusions auxquelles nous sommes parvenu (1).

(1) Un exposé des faits principaux ainsi que des conclusions a été présenté récemment, au IXme congrès international d'Ornithologie à Bâle.

Toutes les espèces du genre *Tetrabothrius* qui se rencontrent chez les Oiseaux, sont susceptible d'être dérivées d'une forme ancestrale commune mais qui ne paraît plus exister aujourd'hui, à partir de laquelle on peut élever un « buisson évolutif » dont les branches principales correspondent, chacune, à un ordre d'Oiseaux déterminé. Chose curieuse, nous avons été amené à conclure que les quatre espèces parasites des *Lari* qui forment respectivement deux groupes distincts, renfermant deux espèces chacun, sont dérivées, séparément, de deux souches dont l'une aurait pris naissance parmi certaines des espèces parasites des Procellariiformes et l'autre, à partir d'une espèce qui se rencontre chez les Pélécaniformes. Nous en concluons que les quatre espèces parasites des *Lari* ont été acquises, secondairement, par ce groupe d'hôtes et qu'elles n'impliquent donc pas l'existence d'une relation éventuelle entre les Goélands, les Pétrels et les Frégates.

Cependant, l'étude comparée des autres espèces du genre *Tetrabothrius* fait nettement ressortir l'existence de relations phylogéniques entre les Procellariiformes et les Sphénisciformes ainsi qu'entre les Procellariiformes et les Pélécaniformes. Les espèces parasites des Gaviiformes et des *Alcae* ont pris naissance sur la branche conduisant aux Pélécaniformes, mais elles ne paraîssent pas avoir évolué dans la suite.

C'est la première fois, à notre connaissance, qu'il a été possible d'établir, ainsi, à l'intérieur d'un genre de Cestode et sur une base morphologique, l'évolution des espèces parallèlement à celle de leurs hôtes. Comme ceux-ci appartiennent, d'autre part, à des Oiseaux de haute mer, donc ségregés écologiquement, il nous a paru intéressant de confronter nos conclusions avec celles de Clay (1950) provenant de l'étude des Mallophages de ces mêmes groupes d'hôtes.

Les Sphénisciformes hébergent deux genres de Mallophages dont la morphologie ne fournit aucun argument en faveur d'une relation quelconque possible entre les Manchots et les autres groupes d'Oiseaux. On a décrit chez les Procellariiformes, quinze genres de Mallophages qui sont, pour la plupart, propres à ce groupe d'hôtes et qui paraîssent avoir évolué à partir d'une forme ancestrale commune. On trouve, en outre, chez les Pétrels, deux genres de Mallophages qui se rencontrent également chez les Charadriiformes et qui représenteraient, d'après Clay, une infestation secondaire pour les Procellariiformes. Ni les Gaviiformes, ni les Pélécaniformes n'hébergent des Mallophages susceptibles d'éclairer les affinités éventuelles de ces Oiseaux avec d'autres ordres. Finalement, l'étude des Mallophages des Charadriiformes ne conduit à aucun résultat positif dans le sens qui nous intéresse ici.

Il est intéressant d'examiner les conclusions auxquelles sont arrivés les ornithologistes modernes quant aux affinités entre les différents ordres qui nous intéressent eu égard les résultats discordants auxquelles parviennent les parasitologistes. D'après Mayr et Amadon (1951), la parenté entre les Manchots et les Pétrels est certaine et il existerait peut-être, quelque lien de parenté entre

ces derniers et les Frégates parmi les Pélécaniformes ainsi qu'avec les Gaviiformes. Il s'ensuit que les résultats que nous avons obtenus par l'étude des Cestodes, correspondraient aux conclusions auxquelles sont amenés les ornithologistes.

On peut se demander, dans ces conditions, quel est la signification des résultats obtenus par Clay et mentionnés plus haut? Il nous semble qu'une première constatation est que les Oiseaux de haute mer hébergeaient déjà leurs Cestodes à l'époque à laquelle ils ont acquis leurs premiers Mallophages et que ceux-ci, par consequent, doivent être considérés, pour ce groupe d'hôtes, comme étant des parasites plus récents que ne le sont les Cestodes.

Ce cas n'est d'ailleurs pas unique, car on observe que dans d'autres groupes d'Oiseaux, les résultats que l'on obtient de l'étude des Mallophages et des Cestodes ne coïncident pas et, qu'au demeurant, c'est plutôt les cas de coïncidence qui sont les plus rares.

Autrement dit, la spécificité parasitaire que l'on constate chez les ectoparasites n'est pas nécessairement identique à celle que l'on peut déduire de l'étude des entoparasites et des Cestodes en particulier. On est ainsi conduit à envisager une évolution indépendante des biotopes « poil » et « plume » et du milieu intestinal. Ce dernier, au demeurant, paraît avoir conservé davantage les caracterès propres à la souche originelle du groupe d'hôtes envisagés que ce ne semble le cas pour le plumage ou la fourrure qui ont, l'un et l'autre, évolué à un rythme plus rapide qui est en rapport avec l'adaptation subséquente des Oiseaux ou des Mammifères à leurs biotopes particuliers.

Nous avons jugé intéressant de faire ressortir ces différents aspects de la spécificité parasitaire avec l'espoir que de nouvelles recherches dans cette direction pourront fournir des résultats plus complèts et permettront, peu à peu, de degager de cet ensemble de faits des données plus précises sur le problème si complexe des rapports entre les parasites et leurs hôtes.

RESUME

En considérant l'hôte en tant que biotope du parasite, on constate qu'il existe des condition écologiques différentes auxquelles sont adaptés les ecto- et les entoparasites. On peut observer, par exemple, que des ectoparasites tels les Mallophages, peuvent être adaptés à des « microclimats » particuliers déterminés par les conditions locales de leur habitat. La spécificité parasitaire est ainsi en relations, entre autre, avec le le degré d'isolement des parasites dans leurs biotopes respectifs.

Chez les *Tetrabothriidae* (*Cestoda*), il a été possible de découvrir dans la structure de l'atrium génital, quatre directions évolutives distinctes, grâce auxquelles on a pû dresser un arbre évolutif des espèces du genre *Tetrabothrius*. Vu le haut degré de spécificité parasitaire que présentent ces Cestodes à l'égard de leurs hôtes, on peut, sur la base de ces données, établir des liens de parenté probable entre leurs hôtes, c'est-à-dire, les Procellariiformes, Sphénisciformes, Pélécaniformes et Gaviiformes.

Ces résultats ne concordant pas avec ceux auxquels on parvient à l'aide des Mallophages ectoparasites, on peut supposer que la spécificité parasitaire s'est établie à différentes époques de l'évolution des hôtes et, en outre, que l'évolution des parasites s'est produite à un rythme différent suivant les biotopes.

RIASSUNTO

Considerando l'ospite quale biotopo del parassita, si constata l'esistenza di condizioni ecologiche differenti a cui sono adattati sia gli ecto- che gli endoparassiti. Si può per esempio osservare che ectoparassiti quali i Mallofagi possono essere adattati a « microclimi » particolari, determinati dalle condizioni locali del loro habitat. La specificità parassitaria è anche in relazione, tra l'altro, con il grado di isolamento dei parassiti nei loro rispettivi biotopi.

Nei *Tetrabothriidae* (*Cestoda*) è stato possibile mettere in evidenza quattro distinte direzioni evolutive nella struttura dell'atrio genitale, ciò che ha permesso di tracciare un albero evolutivo delle specie del genere *Tetrabothrius*. Visto l'elevato grado di specificità parassitaria presentata dai Cestodi nei confronti dei loro ospiti, si può in base a questi dati stabilire i legami di probabile parentela tra gli ospiti stessi, e cioè tra Procellariformi, Sfenisciformi, Pellicaniformi e Gaviiformi.

Poichè questi risultati non concordano con quelli cui si giunge a mezzo dei Mallofagi ectoparassiti, si può supporre che la specificità parassitaria si è stabilita in diversi periodi dell'evoluzione degli ospiti, ed inoltre che l'evoluzione dei parassiti si è prodotta con un diverso ritmo a seconda dei biotopi.

SUMMARY

Considering the host as the parasite's biotope, it is possible to observe different ecological conditions to which are adapted both ecto - and ento - parasites. *Mallophaga*, for instance, may become adapted to « microclimates » peculiar to their habitat. Host specificity is thus related, *inter alia*, to the degree of evolution of parasites within their respective biotopes.

On the basis of genital atrium structure, it is found in *Tetrabothriidae* (*Cestoda*), that there exist four distinct evolutionary directions, making it possible to construct an evolutionary tree. Taking into account the marked degree of host specificity of these parasites, a possible phylogenic relationship of the hosts is postulated, *viz*: Procellariiforms, Sphenisciforms, Pelecaniforms and Gaviiforms.

These results do not coincide with data collected by the aid of *Mallophaga* and it is therefore postulated that host specificity became established at different times during evolution of the hosts and, also, that the rate of evolution of the parasites varies according to their biotopes.

BIBLIOGRAPHIE

BAER, J. G. (1946) Le parasitisme, 235 p., 136 fig., 4 pl. *Lausanne*.

BAER, J. G. (1951) Ecology of animal parasites. 224 p. 162 fig. *Urbana, Illinois*.

BAER, J. G. (1954) Revision taxinomique et étude biologique des Cestodes de la famille des *Tetrabothriidae*, *Mem Univ. Neuchâtel*, Sér in 4°, tome 1, 123 p. 82 fig.

CLAY, TH (1949) Some problems in the evolution of a group of ectoparasites, *Evolution*, *3*, 279-299, 3 fig.

CLAY, TH. (1950) A preliminary survey of the distribution of the Mallophaga (Feather Lice) on the class Aves (Birds), *J. Bombay Nat. Hist. Soc. 49*, 430-443, 3 fig. 2 pl.

MAYR, E. & AMADON, D. (1951) A classification of recent Birds. *Am. Mus. Novitates*, No. 1496, 42 p.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SULL'AZIONE PROTETTIVA DELL'ACTH, DEL CORTISONE, DEL GLUCONATO DI CALCIO, DELLA PIRILAMINA (NEOANTERGAN), DELLA PROMETIAZINA (FARGAN), DELLA CLOROPROMAZINA (LARGACTIL) NEL LATRODECTISMO INDOTTO NELLA CAVIA.

SERGIO BETTINI (*) e GIAMPAOLO CANTORE (**)

Introduzione

In un nostro precedente lavoro (1) abbiamo riportato per esteso l'evoluzione attraverso i tempi dei mezzi di cura impiegati nel latrodectismo, sindrome causata dal morso di specie di ragni appartenenti al genere *Ladrodectus*. I medicamenti che sono stati usati in questa sindrome possono dividersi in due gruppi: medicamenti specifici (sieri immuni) e medicamenti ad azione desensibilizzante aspecifica. Il presente lavoro si riferisce allo studio sperimentale dell'azione protettiva esercitata dal secondo gruppo di sostanze nell'avvelenamento della cavia. Questo gruppo comprende quei medicamenti ad azione desensibilizzante aspecifica, l'azione di alcuni dei quali è già stata studiata nella cura del latrodectismo umano.

Le sostanze ad azione desensibilizzante aspecifica finora impiegata nella cura medica, per quanto a noi risulta, sono: il solfato di magnesio, il gluconato di calcio, il cortisone e l'ACTH, e la prometiazina (Fargan).

Solfato di magnesio. — Sappiamo di un solo autore, il De Asis (2), che abbia usato il solfato di magnesio nel trattamento del latrodectismo (provocato da *L. hasseltii*) nelle Filippine. L'autore ha trattato 4 casi con una soluzione di solfato di magnesio al 25% endovena. I risultati sono stati buoni, ma non certo paragonabili a quelli ottenuti con gli altri medicamenti desensibilizzanti aspecifici sperimentati sull'uomo.

Gluconato di calcio. — Il gluconato di calcio è stato invece largamente usato nella terapia del latrodectismo sin dal 1935, anno in cui Gilbert e

(*) *Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Parassitologia.*
(**) *Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Chimica Terapeutica.*

STEWARD (3) lo impiegarono per la prima volta negli Stati Uniti d'America in 5 casi di latrodectismo da *L. mactans*. Altri Autori (4, 5, 6, 7, 8, 9); trattarono in seguito molti altri casi con gluconato di calcio al 10% endovena. I loro risultati furono molto soddisfacenti. In un sol caso (10) non si ebbero i risultati sperati.

Anche in Italia è recentemente entrato in uso il gluconato di calcio endovena nella cura del latrodectismo da *L. tredecim-guttatus* (1, 11) ed i risultati sono stati analoghi a quelli ottenuti nel latrodectismo da *L. mactans* negli Stati Uniti d'America.

Cortisone e ACTH. — Molto più recente è l'impiego del cortisone e dello ormone ipofisario corticotropo (ACTH) nella terapia del latrodectismo. CLUXTON nel 1951 (12) curò un sol caso dal *L. mactans*, ottenendo la remissione dei sintomi nello spazio di un'ora. Il MARETIC nel 1953 (13) riferisce di un caso di latrodectismo da *L. tredecim-guttatus* trattato con cortisone e ne riporta gli ottimi risultati ottenuti. Da allora il cortisone e l'ACTH furono usati nella cura di numerosi casi di latrodectismo, sia dal MARETIC in Jugoslavia, che da altri Autori negli Stati Uniti d'America con risultati sempre buoni, e tali da confermare l'efficace azione desensibilizzante aspecifica di questi medicamenti.

Prodotti antistaminici. — Non abbiamo riscontrato, nella letteratura consultata, alcuna segnalazione di casi di latrodectismo trattati con antistaminici. Sono solo a nostra conoscenza, per comunicazioni personali, i risultati del GRADOLI (*) che trattò a Montalto di Castro (Viterbo) 26 casi di latrodectismo da *L. tredecim-guttatus* con la prometiazina (Fargan) ottenendo ottimi risultati.

E' chiaro, da quanto sopra riportato, che i dati sul valore terapeutico dei medicamenti ad azione desensibilizzante, sono ancora troppo scarsi per poterli vantaggiosamente impiegare nella terapia futura. Non conosciamo d'altronde alcuna ricerca sperimentale comparativa compiuta su questo argomento. Quindi si è ritenuto utile paragonare direttamente fra di loro varie sostanze ad azione desensibilizzante aspecifica su animali da laboratorio. L'efficacia dei medicamenti in esame è stata valutata considerando come indice la percentuale di animali sopravvissuti alla inoculazione di dosi mortali di veleno. Si è usata la cavia quale animale da esperimento in quanto nei nostri precedenti studi si è dimostrato l'animale più sensibile al veleno del *L. tredecim-guttatus*.

Ai medicamenti antiflogistici già impiegati in Clinica ci è sembrato utile aggiungere per le nostre prove le altre sostanze: la pirilamina (Neoantergan) ad azione antistaminica e la cloropromazina (Largactil) del quale è nota la

(*) Siamo molto grati al Dott. E. GRADOLI, Direttore dell'Ospedale S. Sisto a Montalto di Castro (Viterbo) per averci gentilmente fornito i dati circa i suoi casi di latrodectismo trattati con prometiazina.

spiccata azione neuroplegica, ed in particolare sedativa degli stati ansiosi, condizione che si verifica quasi costantemente nelle fase acuta del latrodectismo umano.

Queste ricerche hanno quindi per oggetto la valutazione comparativa di una serie di medicamenti desensibilizzanti aspecifici, al fine di ottenere elementi indicativi per l'attuazione di una più razionale terapia del latrodectismo umano.

Parte sperimentale

Abbiamo sperimentato su un gruppo omogeneo di cavie particolarmente sensibili al veleno di *L. tredecim-guttatus* provenienti dallo stesso allevamento e del peso di 250-400 gr. Gli animali sono stati tenuti a digiuno per 6 ore prima e per 6 ore dopo le inoculazioni.

Il materiale tossico è stato ottenuto da femmine adulte di *L. tredecim-guttatus* raccolte nella zona di Orbetello durante l'estate del 1953. Il veleno è consistito in ghiandole velenifere essiccate nel vuoto, omogeneizzate, e diluite in soluzione fisiologica e glicerina in parti uguali. Poichè la DL_{50}/Kg. cavia è risultata pari a mg. 0,075 (14), gli animali in esperimento sono stati inoculati con mg. 0,200/Kg. cavia pari a circa 3 DL_{50}. Dosi minori di veleno (mg. 0,170/Kg. cavia) sono state sufficienti a portare a morte tutti i controlli, in numero di 12, in 18 ore. Il veleno è stato somministrato per via sottocutanea.

I medicamenti usati sono stati i seguenti:

1) ACTH (Cortrophine della Ditta Organon (*)).
2) Cortisone acetato (della Ditta Farmitalia).
3) Calcio gluconato al 10% e al 20% (della Ditta Sandoz).
4) Pirilamina :N,N—dimetil—N'— 2—piridil) — N'— (p-metossibenzil) — etilenediammina (Neoantergan della Ditta Farmitalia).
5) Prometiazina : (dimetilammino—2'—metil—2'—etil)—10—fenotiazina (Fargan della Ditta Farmitalia).
6) Cloropromazina: Cloro — 3 — (dimetilammino — 3'— propil) — 10— fenotiazina (Largactil della Ditta Farmitalia).

Le dosi e le vie di somministrazione usate per i medicamenti in esperimento sono riportate nella Tab. I.

In un secondo tempo abbiamo paragonato l'azione del gluconato di calcio al 10% e al 20% su cavie inoculate con un secondo lotto di ghiandole come risulta nella Tab. II.

Risultati e discussione

I risultati delle prove di protezione verso il veleno di *Latrodectus tredecim-guttatus* da parte delle sostanze sperimentate sono riportati nelle Ta-

(*) Ringraziamo le singole Ditte per averci cortesemente messo a disposizione i medicamenti sopra elencati.

TABELLA I

Azione protettiva dell'ACTH, del cortisone, del gluconato di calcio al 10%, della pirilamina (Neoantergan), della prometiazina (Fargan) della cloropromazina (Largactil) verso cavie inoculate con dosi mortali di veleno di Latrodectus tredecim-guttatus. (La durata dell'esperimento è stata di 72 ore).

peso cavie	dose veleno inoculata (1)	medicamento	dose	via di somministrazione	mortalità
250 - 400 gr.	0.170 mg./Kg.	—	—	—	12/12 (2)
»	0.200 mg./Kg.	ACTH	15 mg./Kg.	sottocutanea	10/12
»	—	»	»	»	0/3
»	0.200 mg./Kg.	cortisone acetato	20 mg./Kg.	sottocutanea	9/12
»	—	»	»	»	0/3
»	0.200 mg./Kg.	calcio gluconato 10%	9 cm³/Kg.	endoperitoneale	8/12
»	—	»	»	»	0/3
»	0.200 mg./Kg.	»	»	sottocutanea + endoperitoneale + sottocutanea (3)	7/12
»	—	»	»	»	0/3
»	0.200 mg./Kg.	pirilamina	20 mg./Kg.	sottocutanea	8/12
»	—	»	»	»	0/3
»	0.200 mg./Kg.	prometiazina	20 mg./Kg.	sottocutanea	8/12
»	—	»	»	»	0/3
»	0.200 mg./Kg.	cloropromazina	20 mg./Kg.	sottocutanea	9/12
»	—	»	»	»	0/3

(1) Per via sottocutanea.

(2) Tutti i controlli sono morti entro 18 ore.

(3) Un terzo della dose sottocutanea + un terzo endoperitoneale subito dopo il veleno; un terzo sottocutanea 90 minuti dopo il veleno.

Tabella II

Azione protettiva del gluconato di calcio al 10% e 20% verso cavie inoculate con dosi mortali di veleno di Latrodectus tredecim - guttatus.
(La durata dell'esperimento è stato di 72 ore).

peso cavie	dose veleno inoculata (1)	medicamento	dose	via di somministrazione	mortalità
250 - 400 gr	0.200 mg./Kg.	—	—	—	4/4 (2)
»	»	calcio gluconato 10%	9 cm3/Kg.	sottocutanea + endoperitoneale + sottocutanea (3)	5/5
»	»	calcio gluconato 20%	»	»	4/6
»	—	»	»	endoperitoneale	0/3

(1) Per via sottocutanea.
(2) Tutti i controlli sono morti entro 18 ore.
(3) Un terzo della dose sottocutanea + un terzo endoperitoneale subito dopo il veleno; un terzo sottocutanea 90 minuti dopo il veleno.

belle I e II. Da esse risulta che tutti i medicamenti usati hanno mostrato un certo grado di protezione verso cavie inoculate con dosi mortali di veleno. Tale potere protettivo non varia molto da sostanza a sostanza e si aggira intorno al 33% (17% — 42%).

Non è stato possibile, nemmeno con il gluconato di calcio che dimostra un'azione particolarmente costante, di ottenere una protezione totale o superiore al 50%, anche cambiando la dose, il numero e il modo delle somministrazioni.

Non è nostro scopo, nè rientrerebbe nei fini di questa ricerca, indagare sul meccanismo di azione attraverso il quale ognuno di questi medicamenti agisce nel latrodectismo indotto

In generale, sono stati descritti gli effetti sulle reazioni infiammatorie e l'azione sulla permeabilità capillare e tissulare sia dell'ormone corticotropo (ACTH) e dei glucocorticoidi surrenali sia dello ione calcio, sia ancora dei farmaci antistaminici e della cloropromazina (15).

La protezione parziale da noi osservata nel corso dell'intossicazione delle cavie da veleno di *Latrodectus* può essere comparata ad analoghe osservazioni di protezione rilevate nei fenomeni di shock traumatico, e in intossicazioni da proteine eterogene o da aggressivi chimici, ogni qualvolta che subentrano reazioni flogistiche diffuse. Esse non permettono di indagare precisamente sul meccanismo e sulla natura dell'avvelenamento, probabilmente molto complesso, in cui però il fattore infiammatorio appare di notevole importanza sia negli studi di laboratorio, sia nell'osservazione clinica.

In questo esperimento si è indagato sul grado di protezione che hanno alcuni farmaci verso cavie inoculate con alte dosi di veleno (3 DL_{50}); mentre nei casi clinici si tratta invece di liberare il paziente dalla sintomatologia dolorosa causata da dosi di veleno bassissime e solo eccezionalmente (in casi di particolare sensibilità individuale) di proteggerlo dalla morte. Quindi, quanto si è sopra dimostrato nella cavia, e cioè il fenomeno protettivo di una serie di farmaci verso dosi mortali di veleno inoculate in animali, deve essere considerato solo come *indice* indiretto dell'attività desensibilizzante di tali farmaci nei casi di latrodectismo umano.

E' opportuno paragonare direttamente il potere protettivo di questa serie di farmaci con quello del siero immune specifico. Come già dimostrato (14), piccole quantità di siero immune proteggono il 100% delle cavie inoculate con dosi sicuramente mortali di veleno. Ciò non si verifica con nessuno dei farmaci sperimentati sulla cavia. Tuttavia non bisogna dimenticare che la letteratura riporta che pazienti morsi dal ragno hanno subito un miglioramento notevole, e cioè la scomparsa dei sintomi dolorosi, dopo la prima iniezione di una sostanza desensibilizzante aspecifica (gluconato di calcio, cortisone, Fargan, ecc.), anche se detti sintomi sono riapparsi quando l'azione del farmaco era cessata.

Non è da disconoscere l'utilità che possono avere anche altri medicamenti nei limiti dell'azione specifica verso alcuni dei sintomi di questa complessa sindrome: così, ad esempio, la morfina sul dolore e la neostigmina (16) sulla contrattura della muscolatura addominale, sintomo questo molto frequente nell'avvelenamento umano.

I risultati sopra riportati avvalorano il concetto, già messo in pratica dal Maretic (13), che nella cura del latrodectismo è opportuno abbinare il trattamento aspecifico, con una delle sostanze desensibilizzanti, a quello specifico somministrando siero immune.

RIASSUNTO

Gli AA. hanno saggiato l'azione protettiva di vari medicamenti nell'avvelenamento della cavia inoculata con dosi mortali di veleno di *Latrodectus tredecim - guttatus*. L'ACTH, il cortisone, il gluconato di calcio al 10% e 20%, la pirilamina (Neoantergan), la prometiazina (Fargan) e la cloropromazina (Largactil) hanno tutti dimostrato un certo grado di protezione che si aggira intorno al 33% degli animali inoculati. Viene discusso il valore terapeutico di tali medicamenti nei confronti del latrodectismo umano.

SUMMARY

The authors have tested the protective action of various drugs on guinea pigs poisoned with lethal doses of *Latrodectus tredecim - guttatus* venom. ACTH, cortisone, 10% and 20% calcium gluconate, pyrilamine (Neoantergan), prometiazine (Fargan) and chloropromazine (Largactil) have all shown a certain degree of protection which runs to about 33% of the injected animals. The authors discuss the therapeutic value of such drugs in relation to human latrodectismus.

BIBLIOGRAFIA

1) BETTINI S. e CANTORE G. (1953): *Arch. It. Sc. Trop. Parass.*, *34*, 136.
2) DE ASIS C. (1934): *Am. J. Trop. Med.*, *14*, 33.
3) GILBERT E. W. e STEWART C. M. (1935): *Am. J. Med. Sc.*, *189*, 532-536.
4) GINSBERG H. M. (1937): *California and West. Med.*, *46*, 381.
5) VAIL A. D. (1939): *J. Missouri Med. Ass.*, *36*, 330.
6) ROSS K. E. (1941): *Osteopathic Profession*, *8*, 26.
7) THESING H. J. (1945): *Cincinnati J. Med.*, *26*, 63-71.
8) GREER E. R. (1949): *New England J. Med.* *240*, 5-8.
9) MILLER D. G. (1949): *J.A.M.A.*, *139*, 1238.
10) FRANK L. (1942): *Mil. Surg.*, *91*, 329-336.
11) BETTINI S., ANTONINI E. e CANTORE G. (1953): *Arch. It. Sc. Trop. Parass.*, *34*, 579 - 587.
12) CLUXTON M. E. (1951): *Proc. 2nd Clin. ATCH - Conference*, *2*, 445.
13) MARETIC Z. (1953): *J.A.M.A.*, *152*, 609.
14) BETTINI S., RAVAIOLI L. e CANTORE G. (1954): *Rend. Ist. Sup. Sanità*, *17*, 192.
15) ROBSON J. M. e KELLE C. A. (1950): Recent Advances in Pharmacology. J. & A. Churchill Ltd., London.
16) SCHENONE U. (1954): *Bol. chileno Parasit.*, *9*, 27-28.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

RIDESCRIZIONE DI *ANCYLOSTOMA TUBAEFORME* (ZEDER, 1800) PARASSITA DEL GATTO, CONSIDERATO ERRONEAMENTE SINONIMO DI *ANCYLOSTOMA CANINUM* (ERCOLANI, 1859), PARASSITA DEL CANE (*)

E. BIOCCA (**)

Esattamente nel 1800 ZEDER (1800) descriveva un parassita rinvenuto nell'intestino tenue di un gatto, al quale dava il nome di *Strongylus tubaeformis* e del quale forniva i seguenti caratteri.

Strongylus tubaeformis

Strongylus aciformis; corpore lineari.
Cauda *Maris* brevissima, tubaeformis, utrinque triradiata.
Feminae brevis, conica.
Länge: des Männchen 3¼, des Weibchen 4 Linien.

Beschreibung. Unter allen Pallisadenwürmern der zweyten Abtheilung mit der eckigen Mündungslippe trägt keiner diesen Karakter so deutlich als dieser trompetenförmige. Das Kopfende weisslich, weit gemündet, die häutigen Mündungslippen sehr stark und eckig. Der ganze Wurm vom Kopfende bis zum Schwanze walzenrund, linienförmig, graulich.

Das Schwanzende ist an beyden sehr kurz, doch kürzer am Männchen, trompetenförmig, auf beyden Seitenflächen mit drey Radien, wovon zween einander genähert sind, und der dritte von diesen schief wegstehet; alle drey enden mit feinen Häkchen An der Bauchseite läuft von beyden Seiten in einer Vertiefung gegen die Schwanzblase eine gefaltete scharfe Haut und endet mit einem spitzigen Winkel in der Blase selbst. Zwischen dieser bemerkt man eine runde, erhabene und eingekerbte Oeffnung, welche dem Schliessmuskel am After der Pferde ähnelt; höchst wahrscheinlich der After dieses Wurms, durch welchen auch das Zeugungsglied hervorkommt, denn fast an allen Pallisadenwürmern habe ich das männliche Glied aus der Mitte der Blase hervorstehen gesehen.

Am Weibchen ist das Schwanzende kurz kegelförmig und nadelförmig zugespitzt.

Wohnort. Ich fand diese zwey Pallisadenwürmer den 11. April 1783 in dem Zwolffingerdarm einer Katze, und seit dieser Zeit nicht mehr.

(*) Le ricerche sugli Anchilostomi sono sostenute con un fondo messo a disposizione dal Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) *Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma* (Direttore: Prof. E. BIOCCA).

Successivamente RUDOLPHI (1810) accettava nel suo Trattato la validità della nuova specie. Dalla descrizione dello ZEDER e da quella del RUDOLPHI appare evidente l'appartenenza del verme al genere che oggi chiamiamo *Ancylostoma.*

Il RUDOLPHI faceva inoltre osservare che gli altri vermi già segnalati in precedenza nel gatto, quale *Ascaris cati* di MOLIN e *Ascaris crenata* di SCHRANK probabilmente sono gli stessi parassiti studiati da ZEDER, ma che non è possibile affermare ciò con certezza, per l'insufficienza delle descrizioni.

Strongylus tubaeformis di ZEDER quindi deve essere considerato come la prima sicura segnalazione di un anchilostoma del gatto.

Il nome di genere *Strongylus* fu sostituito con quello di *Agchylostoma* dal DUBINI (1843) (nome cambiato poi, per ragioni fonetiche in *Ancylostoma*) per indicare appunto un gruppo più ristretto di specie. Tuttavia nel 1845 il DUJARDIN (1845) propose il nuovo nome *Dochmius* che venne lungamente seguito.

Nel 1861 MOLIN (1861) ridescrisse più ampiamente il parassita del gatto sotto il nome di *Dochmius tubaeformis* e lo disegnò con tre paia di denti ventrali nella capsula boccale. I caratteri però forniti dal MOLIN nella descrizione e nei disegni sono ancora molto schematici e tali da non permettere una diagnosi differenziale con il parassita scoperto da ERCOLANI (1859) nel cane e chiamato strongilo del cane o *Sclerostoma caninum* di cui trascriviamo integralmente la descrizione:

« Corpo bianco opaco, o grigiastro, sottile, cilindrico, la femmina alle due estremità attenuata, il maschio solo anteriormente. Testa obliquamente elevata, rigonfia e anteriormente troncata, sostenuta da una campana interna di sostanza cornea che costituisce in tutta la sua ampiezza una vasta cavita boccale, all'orlo superiore della quale, verso la linea mediana e lateralmente sono collocati per ogni parte tre grossi e corti uncini rivolti all'indentro e sostenuti ognuno da un grosso rigonfiamento alla base, il mezzano di ogni lato è il maggiore e il più forte, il più esterno il più piccolo. Coda del maschio terminata da una borsa larga, campanulata con due grossi lobi laterali. Da 8 a 10 linguette o costole sostengono la detta espansione, la dorsale è bifida. Coda della femmina ottusa, terminata bruscamente con una corta e sottile punta o appendice mucronata. Apertura della vulva bilabiata verso il terzo inferiore del corpo, ano a poca distanza dalla coda.

Lunghezza del verme da 8 a 20 millimetri.

Nel 1876 a Rovellasca, in Provincia di Como, B. GRASSI ancora studente di medicina osservò una moria di gatti e dimostrò che era provocata da un anchilostoma che nel 1877 venne descritto dal PARONA e dal GRASSI come una nuova specie e chiamato *Dochmius Balsami* (1877).

Ricorderemo che appunto questa anchilostomiasi dei gatti permise al GRASSI e ai suoi collaboratori di fare le mirabili ricerche sulla anchilostomiasi animale e umana. Gli Autori, nel discutere la diagnosi differenziale con le altre specie di anchilostomi, confrontarono i caratteri del loro parassita con quelli che erano stati descritti dal MOLIN per *Dochmius tubaeformis* e giun-

sero alla conclusione che doveva trattarsi di specie diverse. Infelicemente la descrizione del PARONA e del GRASSI è sommaria, non fornisce misurazioni e non permette una diagnosi differenziale con *A.caninum*.

Nel 1885 lo STOSSICH (1885) rivedendo le specie del genere *Ancylostoma* considerò *Dochmius Balsami* come sinonimo di *A.tubaeforme*. Anche la descrizione però fornita dallo STOSSICH è imperfetta e sommaria, mancante come le precedenti di ogni misurazione di organi, per cui i successivi autori hanno considerato gli anchilostomi descritti col nome *tubaeforme* e *Balsami* come sinonimi di *A.caninum*, ritenuta l'unica specie di anchilostoma, provvista di tre paia di deti ventrali, parassita di carnivori domestici e selvaggi.

Nel 1925 però lo CHANDLER (1925) osservava a Calcutta la mancanza di anchilostomi tra i gatti della zona, mentre accertava la loro presenza tra i cani e così ALLEN SCOTT (1929) ripeteva analoga osservazione a Baltimora giungendo alla conclusione che la letteratura relativa all'anchilostoma del gatto era in uno stato molto insoddisfacente (*). Persuaso che si trattasse di un comportamento biologico particolare di stipiti diversi, lo SCOTT eseguì numerose ricerche sperimentali tentando infestazioni crociate. I risultati dimostrarono che mentre una media del 45% delle larve provenienti dal gatto maturavano nei gattini, meno dell'1% maturavano nei cuccioli. Così mentre una media del 50% delle larve provenienti dal cane maturavano nei cuccioli, meno del 5% delle stesse larve maturavano nei gattini.

Secondo ALLEN SCOTT (1929) le esperienze avrebbero dimostrato che i due ceppi considerati dall'A. morfologicamente identici, sarebbero biologicamente diversi nella loro adattabilità ai diversi ospiti.

* * *

Nello studio del genere *Ancylostoma* (Dubini, 1843) abbiamo attentamente esaminato la specie *A.caninum* confrontando esemplari raccolti in cani, gatti e carnivori selvaggi di diverse provenienze. (Collezione personale, dell'Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma e dello Zoo di Roma, collezione della London School of Hygiene and Tropical Medicine, collezione dell'Institut de Parasitologie dell'Università di Parigi, collezione dell'Istituto di Zoologia di Napoli, collezione personale del Dr. P. L. LE ROUX di Londra e del Dr. O. WAGNER di Francoforte sul Meno) (**).

Siamo così giunti alla conclusione che esistono chiari e costanti caratteri morfologici differenziali tra gli anchilostomi del cane e quelli del gatto e che quindi si tratta di due diverse specie del genere *Ancylostoma*, ambedue con tre paia di denti ventrali nella capsula boccale.

(*) Recentemente in Italia anche SAGGESE del nostro Istituto (lavoro in pubblicazione) ha potuto confermare che l'anchilostomiasi dei gatti è presente in alcuni comuni della Provincia di Campobasso, mentre manca assolutamente tra i cani catturati nelle stesse zone.

(**) Esprimiamo la nostra riconoscenza a tutti coloro che ci hanno generosamente e gentilmente fornito il materiale che ci ha permesso di eseguire queste ricerche.

Ancylostoma caninum, con i caratteri maggioremnte precisati da LANE (1916) e da tutti accettati (sopratutto la brevità degli spicoli che non raggiungono 1 mm di lunghezza e la distribuzione delle costole laterali nella borsa caudale) è il parassita del cane, mentre da esso si allontana la specie presente nel gatto.

Abbiamo a lungo meditato se fosse più opportuno creare una specie nuova per il parassita del gatto senza tenere conto delle incomplete descrizioni del secolo scorso o se fosse preferibile ammettere che la prima descrizione di un parassita con i caratteri del genere *Ancylostoma* nel gatto debba essere ritenuta valida e quindi ridescrivere accuratamente la specie col nome di *tubaeforme*, che per primo le fu posto.

Abbiamo seguito questo secondo punto di vista, sopratutto al fine di semplificare e snellire la ormai complessa e pesante classificazione dei nematodi, evitando così la proposta di un nome nuovo.

Potrebbe essere obiettato che nel gatto si possono trovare altri anchilostomi, la cui capsula boccale però ha un solo paio di voluminosi denti ventrali oltre a un paio di denti rudimentali (*A.braziliense* e *A.ceylanicum*); inoltre i giovani gatti sono suscettibili a lievi infestazioni sperimentali con specie di anchilostomi di altri carnivori. Abbiamo infatti osservato con P. L. LE ROUX una infestazione sperimentale del gatto con *A.pluridentatum* (Alessandrini, 1905) proveniente da materiale del Giardino Zoologico di Londra. La descrizione incompleta di ZEDER, in cui manca anche la segnalazione del numero di denti ventrali nella capsula boccale potrebbe quindi riferirsi a una specie diversa da quella da noi studiata.

Poichè però già il MOLIN nel 1861 disegnava le tre paia di denti ventrali in questo parassita del gatto e poichè nelle infestazioni spontanee del gatto, sia domestico che selvatico, abbiamo riscontrato in Europa (Italia, Francia e Germania) costantemente e solamente una sola specie di *Ancylostoma*, riteniamo che si possa presumere, senza eccessivo timore di errare, che la prima segnalazione di un anchilostoma nel gatto, fatta appunto in Europa dallo ZEDER nel 1800, si riferiva alla stessa specie oggetto delle nostre ricerche.

MORFOLOGIA DI *A. tubaeforme* (ZEDER, 1800) (*)

Sinonimo. *Ancylostoma Balsami* (Parona e Grassi, 1877); *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) pro parte.

Corpo biancastro, cilindrico, attenuato alle due estremità nella femmina, attenuato solo anteriormente nel maschio. Cuticola spessa, striata trasversal-

(*) Le misurazioni, le quali vengono eseguite sempre ed inevitabilmente su numeri limitati di individui, vanno, secondo noi, accettate come semplici caratteri indicativi. In base alla nostra esperienza ci sembra di poter concludere che le misurazioni di maggiore importanza diagnostica per la specie *tubaeforme* siano la lunghezza dell'esofago, la lunghezza degli spicoli e la lunghezza della coda della femmina.

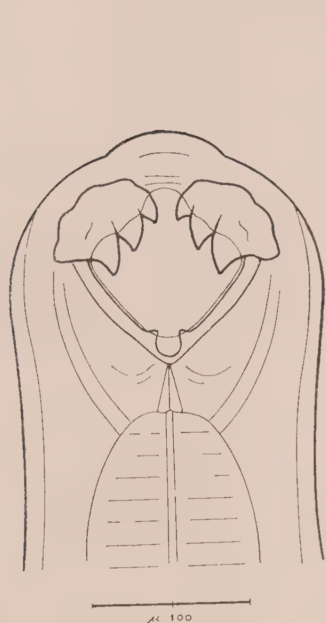


Fig 1



Fig. 3

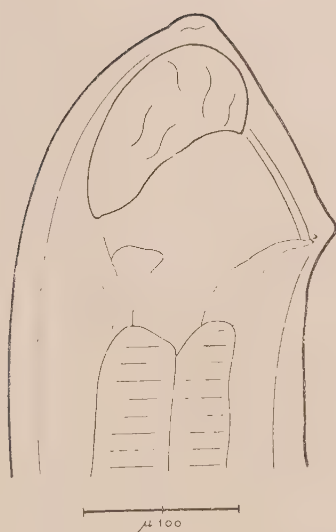


Fig 2



Fig. 4

Fig. 1. - *Ancylostoma tubaeforme* Estremità anteriore vista dorsalmente.
Fig. 2. - *Ancylostoma tubaeforme.* Estremità anteriore vista lateralmente.
Fig. 3. - *Ancylostoma tubaeforme.* Borsa caudale vista lateralmente.
Fig. 4. - *Ancylostoma tubaeforme.* Borsa caudale vista dorsalmente.

mente con strie distanti 6-8,5 μ. La capsula boccale possiede ventralmente due robuste placche chitinose, provviste di tre voluminosi denti diretti all'indentro. Nel margine dorsale si osserva una incisura rotondeggiante le cui due estremità libere sono munite rispettivamente di un tubercolo o «dente dorsale». La cuticola ricopre buona parte dei denti ventrali e dell'incisura dorsale. Al di sotto dell'incisura dorsale è visibile l'ispessimento della capsula diretto verso l'esofago. Nella parte ventrale della cavità boccale si trovano due robuste lancette faringee che osservate per trasparenza in posizione laterale della capsula boccale sporgono profondamente verso l'interno della cavità boccale; il loro margine superiore appare come una linea curva.

L'esofago, rigonfio nella sua parte posteriore, si apre nell'intestino per mezzo della valvola lobata. L'anello nervoso circonda l'esofago nella seconda parte della metà anteriore; il poro escretore si apre in genere al livello della metà dell'esofago e le papille cervicali, ben evidenti, non hanno una posizione sempre costante, trovandosi però di regola alquanto più caudalmente della metà dell'esofago.

Maschio (misurazioni su 15 esemplari di diverse provenienze): lunghezza mm 7-12; larghezza massima μ 300-380; Esofago, lunghezza μ 710-800.

Spicoli uguali, con estremità prossimale dilatata; lunghezza mm 1,200-1,500 Gubernaculum di forma angolare e dilatato nella sua metà distale, lungo 85-95 μ per una larghezza massima di 18-22 μ; Borsa caudale di modeste proporzioni, larga, quando completamente aperta mm 1-1,2. Papille preborsali presenti. Il lobo dorsale è trilobulato, diviso abbastanza chiaramente dagli altri due lobi. La costola dorsale si divide in due rami a circa 50-60 μ dall'estremità libera del lobo e ognuno di questi rami termina in tre digitazioni; le due digitazioni interne, da ogni parte, si originano in genere a un livello più distale della digitazione esterna. Le due costole esternodorsali hanno origine dalla costola dorsale, in genere in corrispondenza del secondo quinto della costola dorsale stessa.

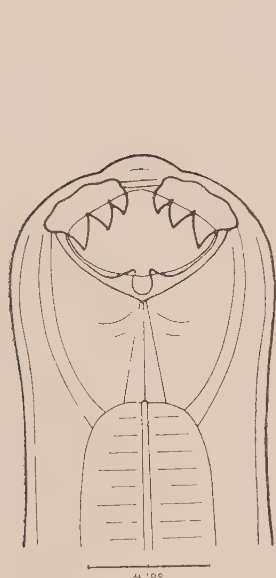
I lobi laterali sono particolarmente piccoli, le tre costole laterali hanno una origine comune; le due costole posterolaterale e mediolaterale hanno un decorso piuttosto ravvicinato, mentre la costola esternolaterale diverge fortemente dalle altre due. Il rapporto tra la distanza delle papille terminali posterolaterale-mediolaterale e mediolaterale-esternolaterale è di regola lievemente superiore a 1:2.

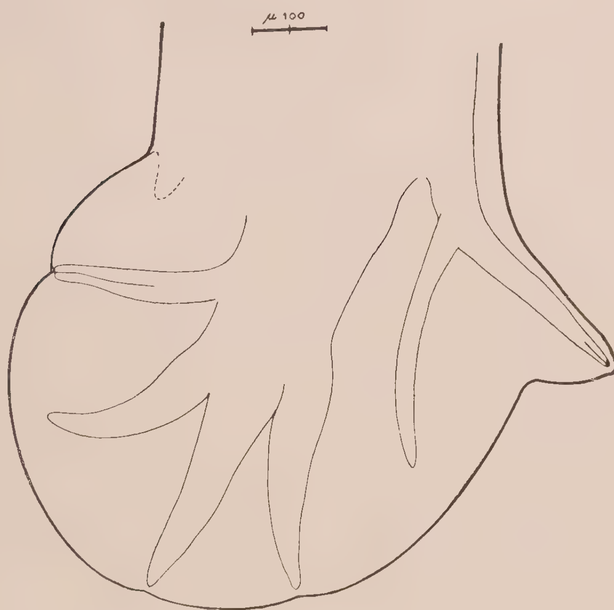
Le costole ventrali decorrono, come nelle altre specie del genere *Ancylostoma*, parallele fino al margine della borsa.

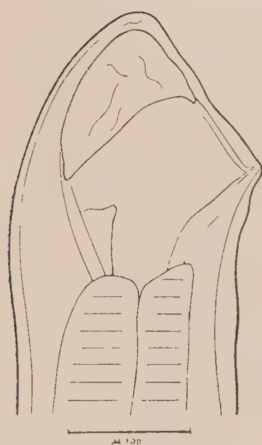
Cono genitale prominente nell'interno della borsa.

Femmina (misurazione su 15 esemplari di diverse provenienze): Lunghezza mm 9-13; Larghezza μ 330-440; Esofago μ 780-820.

Tubi genitali lunghi e sottili. Apertura vaginale nel terzo medio in pros-







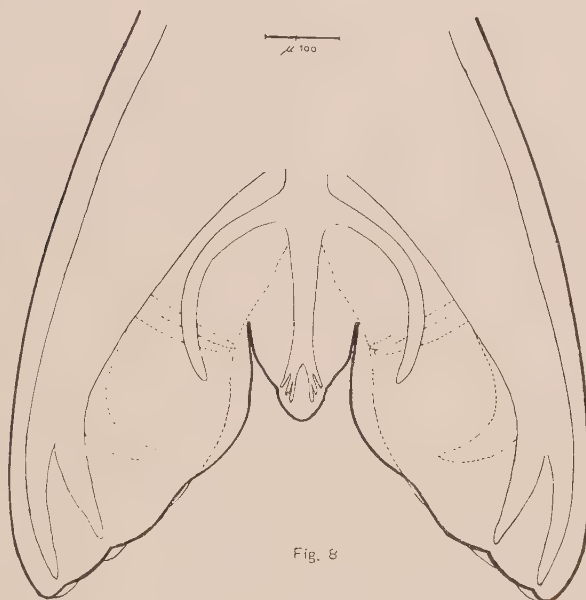


Fig. 5. - *Ancylostoma caninum.* Estremità anteriore vista dorsalmente.

Fig. 6. - *Ancylostoma caninum.* Estremità anteriore vista lateralmente.

Fig. 7. - *Ancylostoma caninum.* Borsa caudale vista lateralmente.

Fig. 8. - *Ancylostoma caninum.* Borsa caudale vista dorsalmente.

simità del terzo posteriore del corpo. Apertura anale a μ 145-185 dall'estremità della coda, la quale è irregolarmente conica, appiattita in senso antero-posteriore e termina con una punta.

Uova: μ 58-68 × 36-44 (misurate nell'interno dell'utero).

Ospite: *Felis catus, Felis silvestris.*

Habitat: Intestino tenue.

Distribuzione geografica: cosmopolita.

Caratteri differenziali tra *A.tubaeforme* e *A.caninum*

Esistono molti caratteri morfologici differenziali tra le due specie; noi ci limiteremo a segnalare quelli che, a nostro avviso, sembrano più evidenti, pur ammettendo che ne possano esistere altri ancora più importanti che siano sfuggiti alla nostra osservazione.

Forma e dimensioni: In genere *A. tubaeforme* è leggermente più corto e chiaramente più sottile di *A.caninum*. La cuticola di *A.tubaeforme* appare quindi proporzionalmente più spessa di quella di *A.caninum* appunto perchè la larghezza massima del corpo di quest'ultimo è maggiore, mentre le cuticola ha le stesse dimensioni o è più sottile di quella di *A.tubaeforme*.

Estremità anteriore: L'estremità anteriore di *A. tubaeforme* ci è aparsa in genere leggermente più rivolta all'indietro e la capsula boccale leggermente più corta. Le tre paia di denti ventrali sembrano relativamente più robuste di quelle corrispondenti di *A.caninum* a differenza delle due protuberanze chitinose dorsali (dentini dorsali) che sembrano più voluminose in *A.caninum*. Le lamine faringee, osservate per trasparenza attraverso la capsula boccale in posizione laterale, appaiono in *A.tubaeforme* più sporgenti verso la cavità boccale e il loro margine superiore libero si disegna come una linea più curva e a concavità diretta verso la parte caudale del corpo.

L'esofago in *A.caninum* è chiaramente più lungo che in *A.tubaeforme*.

Maschi.

Spicoli e borsa caudale: Senza dubbio i caratteri differenziali più marcati sono a carico degli organi genitali maschili. Gli spicoli di *A.caninum* non raggiungono il millimetro di lunghezza, mentre quelli di *A.tubaeforme* sono sempre più lunghi, potendo raggiungere e superare mm 1,3-1,4. La borsa caudale di *A.caninum* è chiaramente maggiore, sopratutto in corrispondenza dei due lobi laterali e questo carattere è molto evidente. Così anche la distribuzione delle costole che sorreggono la borsa è differente tra le due specie sopratutto in corrispondenza delle costole laterali. In *A.caninum* infatti, come aveva segnalato Lane, le costole mediolaterale e dorsolaterale sono separate da una incisura profonda (considerevolmente più profonda di quella esistente tra l'esternolaterale e mediolaterale); queste costole sono divergenti e le loro papille terminali si trovano a considerevole distanza l'una dall'altra. In *A.tu-*

baeforme le costole mediolaterale e dorsolaterale sono molto più ravvicinate, l'incisura che le divide non è così profonda e la costola esternolaterale è chiaramente più divergente che in *A.caninum.* (*)



Fig. 9. - *Ancylostoma tubaeforme.* Borsa caudale aperta. Osservare la distribuzione caratteristica delle costole laterali (Foto del Prof. O Wagner Francoforte sul Meno).

Volendo, in analogia a quanto abbiamo calcolato negli altri anchilostomi da noi descritti (1950) fare un rapporto tra la distanza che divide le papille terminali delle costole laterali, troviamo, come risultati medi su individui di diverse provenienze, che il rapporto della distanza tra le papille terminali

---

(*) Ci sembra, dallo studio della descrizione originale dello Zeder, che questo carattere decisivo sia stato perfettamente individuato dall'Autore e che a questo preciso carattere Egli si riferisca quando descrive la superficie laterale della borsa caudale «... auf beyden Seitenflächen mit drey Radien, wovon zween einander genähert sind, und der dritte von diesen schief wegstehet; ...».

delle costole mediolaterale-postolaterale e mediolaterale-esternolaterale è in *A.caninum* di regola inferiore e 1:1,5 mentre in *A.tubaeforme* si aggira intorno, superandolo spesso, al rapporto di 1:2.

La distribuzione delle costole laterali in queste due specie di anchilostomi è strettamente analoga a quanto da noi descritto come carattere differenziale tra *A.duodenale* e *A.paraduodenale*. Nessuna confusione è però possibile tra queste specie che hanno due paia di denti ventrali e un terzo dente rudimentale e *A.caninum* e *A. tubaeforme* provviste di tre voluminose e robuste paia di denti ventrali.

Femmine.

Nella femmina di *A.caninum* la distanza tra l'ano e la punta della coda è maggiore che in *A.tubaeforme* e la coda stessa ha una base più larga.

TABELLA 1.

Misurazioni comparative tra 4 individui delle due specie, di lunghezza corrispondente.

	MASCHIO		FEMMINA	
	A. caninum	*A. tubaeforme*	*A. caninum*	*A. tubaeforme*
Lunghezza	11	11	11	11
Larghezza	0,430	0,320	0,460	0,350
Esofago	0,930	0,780	0,960	0,800
Spicoli	0,910	1,280	—	—
Dist. ano - punta coda . . .		—	0,210	0,175

Le misure sono indicate in millimetri.

CONSIDERAZIONI SU *A. caninum* VAR. *longespiculum* MÖNNIG

Ancylostoma caninum secondo la precisa ridescrizione del LANE è caratterizzato sopratutto dalla relativa brevità dei suoi spicoli. Questo importante carattere ha indotto il MÖNNIG (1938) a creare una varietà *A.caninum* var. *longespiculum* per un parassita rinvenuto in un piccolo felino selvaggio africano, *Felis ocreata cafra*, il quale, oltre al possedere un paio di tre robusti denti ventrali nella capsula boccale, aveva anche spicoli più lunghi di un millimetro.

Riportiamo le principali misurazioni comparative della tabella di Mönnig:

	MASCHIO		FEMMINA	
	A. caninum	*A. caninum* var. *longespiculum*	*A. caninum*	*A. caninum* var. *longespiculum*
Lunghezza	8,8 - 10	10 - 10,2	9,8 - 14	10,2 - 11,5
Larghezza	0,350 - 0,360	0,290 - 0,340	0,450 - 0,560	0,390 - 0,450
Esofago	0,860 - 0,870	0,720 - 0,780	1,05 - 1,2	0,780
Spicoli	0,850 - 0,890	1,43 - 1,62	—	—
Dist. ano - punta coda	—	—	0,182	0,130 - 0,160

Le misure sono indicate in millimetri.

Evidentemente, secondo noi, non si tratta di una varietà di *A.caninum*, ma di *A.tubaeforme* o più probabilmente di una sua varietà. Il problema degli anchilostomi dei carnivori selvaggi, riuniti sotto il nome di *A.caninum* per il semplice fatto di avere tre paia di denti ventrali nella capsula boccale, sarà da noi discusso in altra occasione. Alcuni di questi anchilostomi, come per es. quelli della volpe europea e dello sciacallo hanno caratteri di *A.caninum*, quelli del gatto selvatico europeo e di alcuni piccoli felini selvaggi africani, hanno caratteri di *A.tubaeforme*, altri infine, quale per es. l'anchilostoma della tigre, non possono essere riportati con sicurezza a nessuna di queste due specie.

RIASSUNTO

Viene ridescritta la specie *Ancylostoma tubaeforme* (Zeder, 1800), parassita del gatto, finora confusa con la specie *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) parassita del cane, ambedue fornite di tre paia di denti ventrali nella capsula boccale. *A. tubaeforme* è leggermente più piccolo, rivestito di una spessa cuticola e si differenzia da *A. caninum* fondamentalmente per avere l'esofago di dimensioni minori, gli spicoli molto più lunghi, terminanti in una borsa caudale con diversa distribuzione delle costole laterali e chiaramente più piccola nei suoi lobi laterali.

Viene discussa la posizione sistematica di *A. caninum* var. *longespiculum* Mönnig, 1938, parassita di un piccolo felino africano, *Felis ocreata cafra*, i cui caratteri permettono di riportarlo ad *A. tubaeforme*, del quale rappresenta probabilmente una varietà.

SUMMARY

A new description is given of the species *Ancylostoma tubaeforme* (Zeder, 1800), a parasite of the cat, erroneously confused with the species *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) a dog's parasite; both species having three pairs of ventral teeth. *A. tubaeforme* is slightly smaller, covered with a thick cuticle and fundamentally differentiates from *A. caninum* for having shorter oesophagus and far longer spicules. The caudal bursa is definitely smaller in its lateral lobes and with a different distribution of lateral rays.

The systematic position of *A. caninum var. longespiculum* Mönnig, 1938 is discussed; this parasite of an African feline, *Felis ocreata cafra*, is considered as belonging to the species *A. tubaeforme* of which it probably represents a variety.

AUTORI CITATI

1) BIOCCA E. (1950): On *Ancylostoma braziliense* (De Faria, 1910) and its morphological differentiation from *A. ceylanicum*. *J. of. Helm.*, *25*, 1-10.
2) BIOCCA E. (1950): On *Ancylostoma paraduodenale*, a new species from felines, closely related to *A. duodenale*. *J. of Helm.*, *25*, 11-18.
3) CHANDLER (1925): The helminths parasites of cats in Calcutta and the relation of cats to human helminth infections. *Indian J. Med. Res.*, *13*, 213-227 (cit. SCOTT).
4) DUBINI A. (1843): Nuovo verme intestinale umano (*Agchylostoma duodenale*) costituente un sesto genere dei nematoidei propri dell'uomo. *Ann. Univ Med. Milano*, *106*, 5-13.
5) DUJARDIN F. (1845): Histoire naturelle des helminthes ou vers intestinaux. Paris.
6) ERCOLANI G. B. (1859): Nuovi elementi teorico-pratici di medicina veterinaria. Bologna p. 513-514.
7) LANE C. (1916): The genus *Ancylostoma* in India aud Ceylon. *Indian J. Med. Res.*, *4*, 71-92.
8) MOLIN R. (1861): Il sottordine degli acrofalli ordinato scientificamente secondo i risultamenti delle indagini anatomiche ed embriogeniche. *Mem. R. Ist. Veneto Sc.*, *9*, 427-633.
9) MONNIG H. O. (1938): « *Ancylostoma hescheleri*, n. sp. » from the Antbear, *Orycteropus afer*, with a note on a new variety of *A. caninum*. *Vychr. natur. Ges. Zurich*, *83*, 1-5.
10) PARONA C. e GRASSI B. (1877): Di una nuova specie di *Dochmius* (*Dochmius Balsami*). *R. Ist. Lomb. Sc. e lett. 10*, 190-195.
11) RUDOLPHI C. A. (1910): Entozoorum sive vermium intestinalium historia naturalis. Amstelodami in Taberna Libraria et Artium Vol. 2°, 236.
12) SCOTT A. J. (1929): Experimental demonstration of a strain of the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*, especially adapted to the cat. *J. of Parasit.*, *15*, 290-315.
13) STOSSICH M. (1895): Il genere *Ankylostomum* Dubini. Trieste. Tip. Lloyd Austriaco.
14 ZEDER J. G. H. (1800): Erster Nachtrag zur Naturgeschichte der Eingeweidewürmer, mit Zusätz und Anmerkungen herausgegeben. Leipzig. p. 74-75.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SULLE VARIETA' MORFOLOGICHE DI *ENTAMOEBA HISTOLYTICA.* - I.) DIAMETRO DELLE CISTI

G. BUCCO (*) e G. CHIEFFI (*)

Nel 1914 UJIHARA richiamò l'attenzione, per primo, sulla variabilità del diametro delle cisti di *Entamoeba histolytica,* seguito da altri autorevoli ricercatori. Sull'argomento però le opinioni furono talvolta discordanti: infatti UJIHARA affermò che si potevano distinguere 5 tipi di cisti con diametri medi, rispettivamente di 5,8; 8,5; 10,24; 11,95; e 13 μ. WENYON e O'CONNOR (1917) affermarono recisamente che la specie *E.h.* è composta di varie razze differenziabili per il diverso diametro delle loro cisti. DOBELL e JEPPS (1918) affermarono l'esistenza di almeno 5 razze di *E. histolytica,* cui però attribuirono i rispettivi diametri medi di 6,6; 8,3; 11,6; 13,3; e 15 μ; SMITH (1919) mise in dubbio che esistessero più di due o al massimo tre razze di *E. h.*. BOECK (1923) distinse tre razze, con diametri medi di 6,9; 10-12 e 13-15 μ. SAPERO, HAKANSSON e LOUTTIT (1946) sostennero l'esistenza solo di due razze, il cui limite di divisione è rappresentato da 9 μ. In ogni modo non sembra che siano state numerose le indagini sistematiche onde stabilire le possibili variazioni del diametro delle cisti di *E. h.*

Onde apportare un modesto contributo su questo problema, abbiamo praticato sistematicamente, negli ultimi cinque anni, la misurazione dei diametri delle cisti in 69 pazienti ricoverati nella nostra Clinica con quadro clinico manifesto di colite amebica. In questi 69 pazienti è stato misurato un totale di 3965 cisti, ossia in media circa 57 cisti per paziente. In 29 pazienti sono stati misurati anche 1925 trofozoiti. Il diametro delle cisti e dei trofozoiti era determinato a fresco su strisci di feci diluite con soluzione fisiologica; abbiamo escluso la misurazione delle cisti ricercate dopo arricchimento con il metodo di Faust e dopo colorazione con il Lugol o con ematossilina di Heidenhain, metodi che comportano errori di valutazione per le necessarie manipolazioni

---

(*) *Clinica delle malattie infettive e delle malattie tropicali dell'Università di Napoli* (Direttore: Prof. I. JACONO).

(coartazione, ecc.). Strisci di controllo venivano fissati in Schaudinn e colorati con ematossilina di Heidenhain.

Nei 69 pazienti esaminati non sono stati compresi quelli che presentavano le forme che raggiungevano i 38-40 μ e che d'altronde sono state osservate raramente.

La distribuzione numerica delle cisti, secondo il diametro, risulta dal grafico 1 (fig. 1).

Dalla nostra indagine scaturiscono le seguenti considerazioni:

1) le cisti di *E. h.* possono presentare notevoli variazioni di diametro;

2) appare difficile stabilire un numero ben definito di ceppi di un determinato diametro, perchè sembra esservi una scala dai valori minimi ai massimi. La distribuzione dei valori osservati fa rilevare una diminuzione di frequenza delle cisti in corrispondenza dei valori compresi fra 9 e 11 μ, il che però, secondo noi, non autorizza a condividere l'opinione di SAPERO e coll. (1946) che si debba riconoscere l'esistenza di due razze distinte; si può, tutt'al più, stabilire un limite convenzionale, fra cisti di diametro piccolo e cisti di diametro grande. Secondo i nostri dati, questo limite sarebbe rappresentato da 10 μ.

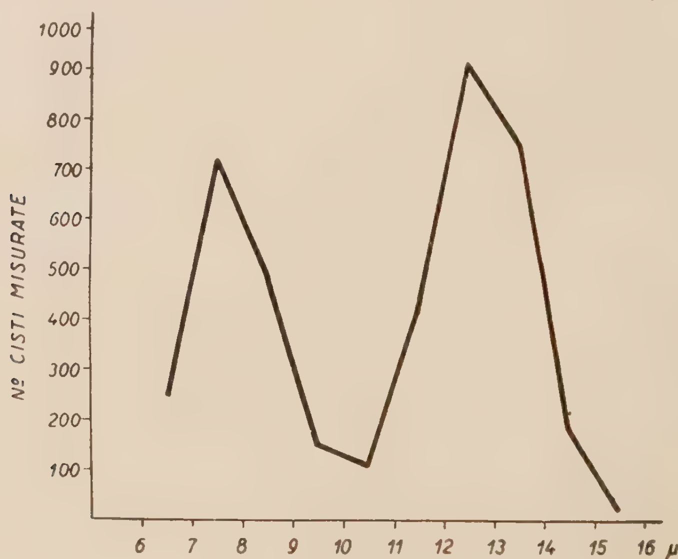


Fig. 1

Accettando tale divisione convenzionale, fra cisti di diametro inferiore a 10 μ e cisti di diametro superiore a 10 μ, facciamo inoltre rilevare:

1) che 26 soggetti (cioè il 37,7%) presentavano solo cisti di diametro inferiore a 10 μ;

2) che 41 soggetti (cioè il 59,4%) presentavano solo cisti di diametro superiore a 10 μ;

3) che due soggetti (cioè il 2,8%) presentavano cisti di ambedue le classi.

Ammessa l'esistenza di varie classi, distinguibili in base al diametro, dobbiamo noi considerare queste classi ceppi o razze di *E. h.?*

Il nostro ragionamento si riferirà, per semplicità espositiva, alle due classi che sembrano potersi raggruppare secondo un metodo statistico, seppure non intendiamo escludere che le classi possano essere anche più numerose, dipendendo ciò dalla interpretazione statistica dei dati.

Il primo punto da esaminare è il rapporto fra diametro delle cisti e dei rispettivi trofozoiti.

All'esame coprologico in 13 soggetti con cisti piccole e in 16 soggetti con cisti grandi furono repertati anche i trofozoiti. Si osservò che a cisti di diametro medio di 7,48 μ corrispondevano trofozoiti con diametro medio di 8,05 μ; a cisti con diametro medio di 12,37 μ corrispondevano trofozoiti con diametro di 14,20 μ (Fig. 2).

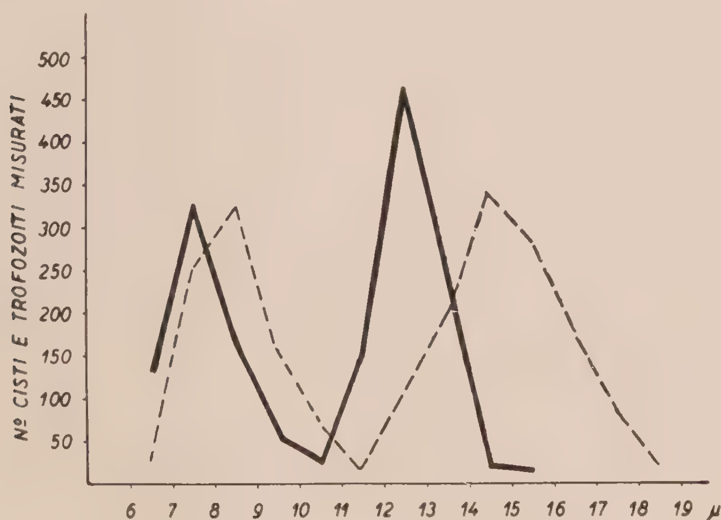


Fig. 2 ———— cisti; .... trofozoiti.

Qualche autore, come Sapero e coll. (1942), ha affermato che le differenze fra il diametro medio delle cisti e quello dei trofozoiti sono significative solo per la classe grande. I nostri dati, invece, mentre confermano il dato di Sapero e coll. per quanto si riferisce alla classe grande, dimostrano che anche nella classe piccola la differenza fra cisti e trofozoiti è significativa, e, per essere precisi, è proporzionale a quella che si rileva fra cisti e trofozoiti della classe grande.

Sebbene non si possa, evidentemente, attribuire alle misurazioni in serie dei trofozoiti viventi la stessa precisione che è possibile applicare alla misurazione delle cisti, ci sembra che in effetti, essendo costante la corrispondenza dei dia-

metri fra cisti e trofozoiti della stessa classe, sia possibile diagnosticare la classe cui appartiene il parassita anche attraverso il diametro della sua forma vegetativa.

E' chiaro quindi che le classi sono morfologicamente differenziabili, secondo il diametro, sia nei riguardi delle cisti che del corrispondente trofozoito.

Ciò premesso, per rispondere al nostro quesito circa l'interpretazione dell'osservazione statistica delle due classi, occorre anche intendersi, prima di ogni altro, sul valore da attribuire ai termini di razze e ceppi che spesso gli autori sembrano aver usato indifferentemente per indicare queste varie forme di *E. h.*

Per razza si intende, da un punto di vista generale, l'insieme di individui che differiscono da quelli di un'altra razza per il diametro, per la forma, per le modalità di moltiplicazione ed altri caratteri; ciascuna razza si mantiene costante entro ampi limiti, cosicchè anche dopo lunghi periodi di moltiplicazione, i caratteri specifici si possono ritrovare nella discendenza.

Noi abbiamo potuto osservare, come esporremo in altra nota (II), che il diametro di *E. h.* è un carattere variabile, perchè in cultura si può osservare il passaggio dalla forma piccola alla grande. Pertanto esso non può essere un elemento valido per differenziare una razza. Non esistono differenze citologiche fra le due classi, nè la moltiplicazione sembra verificarsi con diverse modalità.

E' escluso quindi che si possa ammettere l'esistenza di diverse razze biologiche nel senso di Thorpe (1930), Brierley (1931), Huxley (1940), perchè questi autori ammettono per la differenziazione, oltre il carattere biologico, anche minori caratteri strutturali; si dovrebbe ricorrere al concetto di Hoare (1943, 1952), che pone a base della differenziazione delle razze biologiche solo caratteri biologici, prescindendo da quelli strutturali.

Ora, è vero che noi abbiamo osservato una minore mobilità della classe piccola, dato che a noi sembra di scarsa importanza perchè è facilmente intuibile che la constatazione della mobilità è in diretto rapporto alla dimensione del trofozoito, ed è pertanto un elemento poco significativo come carattere morfologico per differenziare una determinata classe.

Non ci è stato possibile rilevare ematofagia nella classe piccola, se non come carattere eccezionale; ma occorre ricordare che talvolta quando le feci non contengono sangue e sono diarroiche, come in molti dei nostri soggetti, le amebe non contengono corpuscoli rossi; in secondo luogo, giustamente afferma Manson-Bahr (1944) che anche quando la maggioranza delle amebe non contengono emazie, una accurata ricerca ne potrà mettere in evidenza due o tre che le contengono e noi, pur avendo praticata una accurata e ripetuta osservazione, non ci sentiamo autorizzati a escludere che le rare amebe ematofaghe abbiano potuto sfuggirci.

Per quanto riguarda la batteriofagia, poichè sono note le divergenze di autorevoli studiosi sull'esistenza o meno di una fase coprobiotica di *E. h.*, fase in cui il trofozoito fagocita i batterii, non ci sembra, allo stato attuale delle

nostre conoscenze, sia il caso di basare una differenziazione razziale su questo elemento, che, come vedremo, rimarrebbe unico. Infatti, per accettare la distinzione in razze biologiche, è possibile solo una ultima ipotesi, ossia quella che la classe piccola potrebbe non essere patogena; ma, come esporremo in altra nota (III), tale elemento differenziale viene a mancare.

Pertanto, riservandoci di illustrare dettagliatamente nelle altre note gli elementi relativi alle nostre affermazioni sulla variazione e sulla patogenicità delle forme piccole di *E. h.*, ci riteniamo autorizzati a concludere che, mentre esistono senz'altro due o più classi del protozoo, queste debbono ritenersi ceppi e non razze.

E' tutt'ora da chiarire la coesistenza, osservata da SAPERO (1946) e da noi, di cisti grandi e piccole nello stesso paziente; SAPERO spiega il fatto ammettendo che si tratti di razze distinte, il cui diametro non viene influenzato dalle condizioni ambientali; noi, che invece abbiamo constatato la possibile variazione, non possiamo condividere tale spiegazione.

RIASSUNTO

Gli AA. hanno misurato il diametro di 3965 cisti e di 1925 trofozoiti di *Entamoeba histolytica* in 69 pazienti affetti da colite amebica, e hanno potuto stabilire che 26 soggetti (37,7%) presentavano solo cisti di diametro inferiore a 10 μ, 41 soggetti (59,4%) presentavano solo cisti di diametro superiore a 10 μ, due soggetti (2,8%) presentavano cisti di ambedue le classi.

La misurazione dei corrispondenti trofozoiti dimostrava che le classi erano differenziabili nei riguardi sia della forma cistica sia della forma vegetativa.

Gli AA. ritengono che non si possa ammettere l'esistenza di razze diverse di *E. histolytica*, ma solo di ceppi diversi.

SUMMARY

The authors measured the diameter of 3965 cysts and of 1925 trophozoites of *Entamoeba histolytica* in 69 patients suffering with amebic colitis, and they observed that 26 patients (37,7%) had only cysts of diameter below 10 μ; 41 patients (59,4%) had only cysts of diameter above 10 μ, and 2 patients (2,8%) had cysts of both classes.

The measurement of the corresponding trophozoites demonstrated that classes could be differentiated through the cystic form as well as through the vegetative form.

The authors believe that the existence of different races of *E. histolytica* cannot be considered. According to the authors, only different strains are present.

BIBLIOGRAFIA

BOECK W. C. (1923). Description of the more common intestinal protozoa of man. *U.S.P.H.S., Hyg. Lab. Bull.*, no. 133, 74-91.

BRIERLEY W. B. (1931). Biological races in fungi and their significance in evolution. *Ann. Appl. Biol.*, 18, 420-434.

DOBELL C. e JEPPS M. W. (1918). A study of the diverse races of *Endamoeba histolytica* distinguishable from one another by the dimensions of their cysts. *Parasitol.*, 10, 320-350.

HOARE C. A. (1943). Biological races in parasitic protozoa. *Biol Rev.*, 18, 137-144.

HOARE C. A. (1952). The taxonomic status of biological races in parasitic protozoa. *Proc. Linn. Soc. London*, 163, 44-47.

HUXLEY J. (1942). Towards the new systematics. In *The New Systematics*, p. 1, London.

MANSON BAHR P. (1944). The dysenteric disorders. Cassel & Company, London.

SAPERO J. J., HAKANSSON E. G. e LOUTTIT C. M. (1942). The occurrence of two significantly distinct races of *Endamoeba histolytica. Amer. Jour. Trop. Medic.*, 2, 191 - 208.

SMITH A. M. (1919). A contribution to the question of the number of races in the species *Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 13. 1-16.

THORPE W. H. (1930). Biological races in insects and allied groups. *Biol. Rev.*, 5, 177 - 212.

UJIHARA K. (1914). Studien über die Amöbendysenterie. *Zeitschr. Hyg.*, 77, 329-355.

WENYON C. M. e O' CONNOR F. W. (1917). An inquiry into some problems affecting the spread and incidence of intestinal protozoal infections of British troops and natives in Egypt, with special reference to the carrier question, drugs and treatment of amebic dysentery and on account of three new human intestinal protozoa. Part II. *Jour. Roy. Army Med. Corps.*, 28, 151-187.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

STUDI SULLA BIOLOGIA DI *E. HISTOLYTICA*
I) OSSERVAZIONI E RILIEVI SULLA COLTIVAZIONE DI STIPITI ANTOCTONI. (*)

BUONOMINI G. (**), DE BLASI R. (**) e RICCIARDI M. L. (**)

La coltivazione di *E. histolytica* costituisce ancor oggi un interessante e complesso problema biologico non ancora completamente risolto. Gli studi che ad esso si riferiscono possono schematicamente raggrupparsi in tre periodi fondamentali, anche se non sempre cronologicamente successivi.

I periodo: Coltivazione di *E. histolytica* in associazione alla comune flora batterica intestinale, in terreni particolarmente adatti.

II periodo: Coltivazione di *E. histolytica* in associazione a una sola specie batterica o ad un altro protozoo.

III periodo: Coltivazione di *E. histolytica* in coltura pura.

* * *

A) *I periodo: Coltivazione di* E. histolytica *in associazione alla comune flora batterica intestinale, in terreni particolarmente adatti.*

In questa prima fase degli studi, affermatasi la convinzione che *E. histolytica* potesse sviluppare solo in associazione alla flora batterica intestinale, si andò soprattutto alla ricerca dei terreni colturali più adatti allo sviluppo e al mantenimento di tale associazione.

Dopo i primi tentativi di Penfold e coll. (1916), di Yoshida (1918) e di Cutler (1918), furono Boeck e Drbohlav (1925) a coltivare per la prima volta con successo *E. histolytica* in un terreno speciale da loro preparato e indicato comunemente con la sigla L.E.S. (terreno Locke - uovo - siero).

Tale terreno, usato con successo ancor oggi con qualche lieve modificazione, è, come è noto, un terreno difasico, costituito, cioè, nella formula originaria, da una parte solidificata a becco di clarino (uovo coagulato) e da una liquida, che copre la prima (liquido di Locke + siero umano inattivato).

Negli anni successivi vennero via via elaborati sempre nuovi terreni colturali, (alcuni dei quali monofasici), nell'intento di trovare le sostanze più adatte allo sviluppo di *E. histolytica* più la comune flora batterica intestinale.

(*) Le presenti indagini sono state eseguite col contributo del C. N. R.

(**) *Istituto di Igiene e microbiologia dell'Università di Pisa* (Direttore: Prof. G. Buonomini).

La maggior parte di questi terreni è stata di solito preparata su basi puramente empiriche, sostituendo o aggiungendo nella fase solida o in quella liquida, uno o più componenti apparentemente capaci di stimolare e mantenere lo sviluppo dell'ameba.

Abbiamo, così, i terreni all'uovo di DOBELL e LAIDLAW (1926); quelli al siero di DISCHIENS (1926); all'asparagina di TANABE e CHIBA (1928); al fegato di CLEVELAND e COLLIER (1930) con la modificazione di CRAIG (1936); all'estratto di cuore di ST. JOHN (1932); al petone, estratto di carne di TSUCHIYA (1932); all'estratto di fegato (Lilly n. 343) di FRYE e MELENEY (1939); al liquido idatideo o al succo di pomodoro di EL KORDY (1944); all'infuso di tuorlo d'uovo, coagulato di BALAMUTH e SANDZA (1944) con l'aggiunta di fegato (frazione di Wilson) secondo BALAMUTH (1946) o con la modificazione di HITCHCOCK e BAWSON (1946); all'estratto alcoolico di fegato bovino o di cavia secondo NELSON (1947), al sangue di INOKI e coll. (1950); ecc.

Non è nostra intenzione entrare in minuti particolari di composizione e di preparazione dei suddetti terreni, tanto più che recentemente PETTAZZI (1950) ha fatto una rivista sintetica sull'argomento. Ci sembra però utile dare un quadro sintetico dei componenti essenziali di quelli più usati (vedi tab. 1), così da aver rapidamente sott'occhio tutte le sostanze che si sono mostrate utili a promuovere e a mantenere lo sviluppo di *E. histolytica* in associazione alla comune flora batterica.

Menzione a parte meritano inoltre i cosidetti «terreni sintetici» proposti di recente: quali quelli di HANSEN e ANDERSON (1948); di HALLMANN, MICHAELSON e DE - LAMATER (1950); di HANSEN (1950); ecc.

HANSEN e ANDERSON descrissero un terreno «sintetico» liquido, costituito da una soluzione salina tamponata, contenente tracce di sali, 12 aminoacidi, 10 vitamine del complesso B, acido nucleico, colesterina e amido di riso.

HALLMANN e coll. modificarono tale terreno portando il numero di aminoacidi da 12 a 20, aumentando la quantità di triptofano, colesterina, acido nucleico, magnesio e calcio, aggiungendo tracce di glucosio e di glicogeno, albumina purificata di plasma umano e mucoproteina di siero umano ed abolendo l'amido di riso. Il terreno di HANSEN contiene proteose-peptone, fegato (frazione L di Wilson), cisteina, metionina, colesterina e pochi sali inorganici.

Circa l'uso di tali terreni sintetici è possibile avanzare due obbiezioni: 1) la loro costituzione abbastanza complessa; 2) il fatto se essi siano capaci di provvedere alle necessità metaboliche di *E. histolytica* direttamente. La presenza, infatti, nelle colture della flora batterica associata complica enormemente lo studio del fabbisogno nutritizio dell'ameba, giacchè è molto difficile precisare se le sostanze, introdotte nel terreno stimolino direttamente il protozoo o piuttosto i batteri e di conseguenza indirettamente l'ameba.

Pur tuttavia gli studi compiuti in quest'ultimo trentennio per la ricerca di terreni sempre più adatti allo sviluppo e al mantenimento in coltura di *E. histolytica* associata alla comune flora batterica intestinale, ha portato all'acquisizione di alcuni dati fondamentali, che riteniamo opportuno precisare brevemente.

1) *Terreni difasici e monofasici.* — I terreni difasici, creduti prima indispensabili allo sviluppo di *E. histolytica*, possono essere sostituiti, con ovvio vantaggio, da quelli monofasici liquidi (terreno di Balamuth e Sandza, d'Inoki, di Hansen ecc.).

Siamo però dell'avviso che i terreni difasici, e primo tra tutti il terreno di Boeck e Drobhlav specie nella sua recente modificazione), si prestino meglio di quelli monofasici all'isolamento e al mantenimento in coltura di *E. histolytica*.

2) *Polvere di riso.* — La farina di riso addizionata per la prima volta da DOBELL e LAIDLAW, (1926), rappresenta, secondo l'opinione della maggior parte di coloro che hanno lavorato sull'argomento, una sostanza necessaria allo sviluppo di *E. histolytica*.

Infatti quasi tutti i terreni elaborati dal 1926 ad oggi contengono tale sostanza (vedi tab. 1).

L'esatto ruolo che l'amido di riso ha nella nutrizione di *E. histolytica* non è ancora ben chiaro. Secondo DOBELL e LAIDLAW esso rappresenta una importante sorgente d'idrato di carbonio per le amebe; queste possono infatti vivere più a lungo nel ter-

TABELLA N. 1.

Composizione sostanziale dei terreni colturali più comunemente usati per la coltivazione di E. histolytica.

Terreno di	Anno	Struttura	COMPOSIZIONE		
			Parte solida	Parte liquida	Altre sost. aggiunte
Boeck e Drbohlav I	1925	difasico	50 cc. di Locke + 4 uova, coagulato 80°C	siero umano inattivato (1p.) + sol. di Locke (8p.).	amido di riso
Boeck e Drbohlav II			50 cc. di Locke + 4 uova, coagulato 80°C	sol. di Locke modificata	amido di riso
Dobell e Laidlaw	1926	difasico	siero di cavallo coagulato	liquido ovomucoide concentrato	amido di riso e acriflavina (1:20.000)
Dischiens	1926	difasico	siero di cavallo coagulato	1 parte di siero + 7 parti di Ringer	amido di riso
Tanabe e Chiba	1928	difasico	Ringer (1000 cc.) + agar (10 gr.) asparagina (1 gr.)	Ringer + siero di coniglio al 5%	amido di riso
Cleveland e Collier	1930	difasico	agar all'infuso di fegato	siero di cavallo (1p.) + sol. fisiol. (6p.).	amido di riso
Tsuchiya I	1930-34	monofasico	—	brodo	amido di riso (2p.) + carbone animale (2p.)
Tsuchiya II		difasico	Terreno all'uovo di Dorset (3 uova + 3 cc. di Ringer, coagulato)	brodo	»
Balamuth e Sandza	1944	monofasico	—	Estratto di fegato (1p.) + estratto di rosso d'uovo tamponato a pH 7,5 (9p.)	amido di riso
Inoki		difasico n. 1	1000 cc. di Ringer + 10 gr. agar + 1 gr. di asparagina	sangue intero umano (8 cc.) o di coniglio (4 cc.) + sol. fisiol. tamponata a pH 7,6 (80 cc.)	amido di riso
Inoki	1950	difasico n. 2	siero di sangue o di uomo + brodo, coagulato, pH 7,4	id.	amido di riso
Inoki		monofasico	—	sangue intero umano (8 cc.) o di coniglio (4 cc.) + 80 cc. di sol. fis. tamponata a pH 7,6, contenente gr. 0,08 di asparagina.	amido di riso

reno di Boeck e Drbohlav addizionato di amido che non in quello contenente il solo glucosio; non si può però escludere che ciò sia dovuto al fatto che il glucosio viene fermentato facilmente dai batteri con formazione di acidi.

L'ipotesi di HANSEN e ANDERSON, secondo cui la farina di riso rappresenta non solo un sorgente di carboidrati, ma anche un utile sistema tampone non è stata suffragata dai dati sperimentali: sostituendola, infatti, con sostanze dotate di potere adsorbente, (charcool, terra di Fuller, filtercel, celluflour, solfato di bario), non si ottennero risultati probativi.

Secondo HALLMANN e coll. il riso in polvere sarebbe indispensabile per il suo contenuto proteico, tanto da poter essere sostituito dalle proteine estratte dalla polvere stessa; secondo altri Autori, invece (SHAFFER, RODEN e FRYE) l'amido di riso, scindendosi, fornirebbe il glucosio alle amebe. E' pertanto difficile definire con esattezza il ruolo della farina di riso nei processi metabolici di *E. histolytica;* e innegabile, comunque, che i suoi granuli vengono inglobati dalle amebe e che vi è un «optimum» per la quantità necessaria allo sviluppo di esse (SPINGARN e EDELMAN).

3) *Fattori stimolanti la crescita.* — Le sostanze più varie, quali sangue, siero, uovo, fegato, peptone, emoglobina, globuli rossi, vitamine del complesso B, sembrano avere un'azione stimolante sullo sviluppo di *E. histolytica*, ma è difficile identificare in tali sostanze i reali fattori di crescita.

Purtroppo nella letteratura troviamo etichettate spesso sotto questo nome non poche sostanze, che non sappiamo se esplichino una diretta azione favorevole sulla crescita delle amebe o non promuovano invece lo sviluppo di determinate specie della flora batterica associate e quindi agiscono sul protozoo solo in maniera del tutto secondaria e indiretta.

DE - LAMETER e HALLMANN avrebbero isolato dalla frazione non proteica del siero umano una sostanza termostabile e dializzabile; REES e REARDON pensano a qualche componente del bianco d'uovo, mentre HITHCOCK e RAWSON parlano di una sostanza termostabile e solubile in soluzione fisiologica contenuta nel rosso d'uovo. Maggiore importanza sembra avere la colesterina (SNYDER e MELENEY) da sola o associata a otto vitamine del complesso B (REES e coll.), tanto che essa fa parte di alcuni terreni colturali e può, secondo GRIFFIN e MC CARTEN, se addizionata ai terreni in quantità opportuna, sostituire il siero.

Particolare attenzione è stata rivolta al fegato, giacchè non vi è dubbio che le amebe trovino in detto tessuto condizioni tali da poter vivere e moltiplicarsi in assenza di batteri (ascessi epatici di natura amebica). CLEVELAND e SANDERS, inoculando direttamente nel fegato di gatto, dopo laparatomia, colture di amebe in associazione a batteri, notarono che questi venivano rapidamente distrutti dal fegato e le amebe, 7 giorni dopo l'inoculazione, erano presenti in coltura pura nell'ascesso formatosi.

Se si seminano però le amebe in terreni a base di fegato (tipo Cleveland e Collier o Balamuth modificato) la loro coltivazione riesce solo se vengono aggiunti i batteri.

E' logico pertanto pensare alla esistenza nel tessuto epatico fresco, non sottoposto ad alcun trattamento, di un fattore, ancora sconosciuto, capace di promuovere lo sviluppo delle amebe in coltura pura. Tale supposizione è in parte confermata dai risultati ottenuti da LAMY, che sarebbe riuscito a coltivare *E. invadens* (ameba patogena per i rettili) in terreno di Deschiens, addizionato di un frammento di fegato fresco di vipera, prelevato sterilmente.

Contrariamente a quanto affermano DOBELL e LAIDLAW, ANDREWS, JOHNSON e SCHWARTZ (1933) sono dell'avviso che lo sviluppo delle amebe può essere stimolato dall'aggiunta nei terreni colturali di piccole quantità di estratto di feci umane, filtrato per candela Berkefeld.

4) *Modalità di sviluppo.* — Sia nei terreni difasici che monofasici *E.histolytica* cresce al fondo del tubo (BOECK e DRBOHLAV, 1925) nel sedimento costituito dai batteri associati. Sezioni microscopiche colorate della parte solida del terreno hanno dimostrato che le amebe non penetrano in essa; benchè SNYDER e MELENEY (1946) abbiano notato la migrazione di *E. histolytica* su terreni solidi.

Due fattori concorrono a tale modalità di sviluppo: il peso delle amebe e il potenziale di ossido-riduzione del terreno.

Il terreno di Boeck, infatti, come in genere tutti i terreni difasici, offre la possibilità di coltivare *E. histolytica* anaerobicamente, benchè apparentemente la coltura venga incubata aerobicamente, non venga cioè protetta dall'accesso dell'ossigeno atmosferico; è evidente però che i batteri intestinali aerobi, che accompagnano inevitabilmente il protozoo formano un sistema riducente che promuove la crescita non solo di questo, ma anche dei batteri anaerobi, eventualmente presenti nel materiale seminato.

La parte solida costituisce, inoltre, un sistema tampone, dimodochè gli acidi o gli alcali prodotti dai batteri associati, sono rapidamente neutralizzati entro limiti abbastanza ampi.

Come Dobell e Neal hanno sottolineato, è pertanto inutile aggiungere al terreno di Boeck sistemi tamponi, sostanze alcaline o riducenti, o coprire la superficie con uno strato di olio di vaselina, ecc., giacchè detto terreno è costituito in modo da rappresentare, già per sè stesso, un sistema riducente e tamponante.

Le aggiunte o modificazioni su accennate potranno essere utili per terreni monofasici.

5) *Tempo e temperatura d'incubazione.* — L'optimum di temperatura per lo sviluppo di *E. histolytica* è tra 37° - 38° C. Il massimo dello sviluppo si ha al secondo giorno d'incubazione, ma la vita media di una coltura è, in genere, di 4-5 giorni (Boeck e Drobhlav, 1925). Il procedimento, infatti, più correntemente usato è quello di trapiantare le colture ogni 48 ore, benchè non si abbiano differenze notevoli anche trapiantandole ogni 72 ore.

6) *Agitazione delle colture.* — Secondo Balamuth e Howard (1946) si può stimolare lo sviluppo delle amebe con la frequente agitazione del terreno: ciò si può spiegare col fatto che le amebe tendono a crescere raggruppate in aggregati più o meno numerosi, nei quali la moltiplicazione si ha prevalentemente negli elementi più esterni. Con l'agitazione si determina il distacco delle amebe raggruppate e di conseguenza ogni singola cellula ha maggiori possibilità di riprodursi.

7) *pH del terreno.* — Non molto di preciso sappiamo sulla influenza del pH sullo sviluppo di *E. histolytica.* E' comunque opinione generale che le amebe si sviluppino meglio in terreni con pH iniziale di 7,2-7,8, giacchè l'optimum di crescita si avrebbe tra 6,6 e 7,3 (Chang, Shaffer); terreni con pH iniziali al di sotto di pH 7,0 (Shaffer) o verso pH 8,0 (Chang) non permettono la crescita del protozoo.

8) *Potenziale di ossido-riduzione.* — Si ammette in genere uno stretto rapporto tra il potenziale di ossido-riduzione del terreno culturale e lo sviluppo di *E. histolytica;* secondo Jacobs (1950) tale rapporto può oscillare entro limiti piuttosto ampi. Vi è tuttavia un optimum di potenziale per lo sviluppo; esso è, secondo Jacobs (1941) tra - 300 e - 500 mv.; secondo Chang (1946) tra - 350 e - 425 mv.; secondo Hopkins e Warner (1946) al di sotto di - 400 mv.

Per mantenere un potenziale di ossido-riduzione così basso sono state aggiunte ai terreni culturali varie sostanze, quali, ad esempio, la cisteina (Hansen, 1950) o il tioglicollato (Griffin e Michini, Griffin e McCarten, Nakamura, Shaffer e coll.). Alcuni Autori (Brandin e Hansen, Shaffer e coll., ecc.) preferiscono stratificare sul terreno dell'olio di vaselina così da impedire l'accesso all'ossigeno atmosferico.

9) *Anaerobiosi.* — Da quanto si è detto appare evidente come una riduzione abbastanza rilevante della tensione di ossigeno ed un probabile aumento della tensione di CO_2 siano necessari per lo sviluppo di *E. histolytica;* non è però ancora ben precisato se essa sia un'anaerobia obbligata. I dati più recenti e più attendibili dimostrerebbero, che le condizioni anaerobiche sono necessarie per il suo sviluppo e molti Autori (Balamuth e Howard, Brandin e Hansen, Hapkin e Warner, Shaffer e coll. ecc.) hanno concluso che la presenza di ossigeno è nociva per l'ameba. Rees e coll. hanno dimostrato ad esempio, che terreni conservati in tubi chiusi con tappo di cotone sono meno adatti allo sviluppo degli stessi terreni conservati in tubi con tappo a perfetta tenuta.

D'altra parte SHAFFER e coll. avanzano il dubbio se l'ossigeno sia direttamente nocivo o agisca invece indirettamente distruggendo fattori nutritivi, necessari all'ameba, O_2 - labili, e JACOBS è del parere che non sia necessaria la completa rimozione dell'ossigeno dai terreni, sostenendo la possibilità dello sviluppo e della moltiplicazione di *E. histolytica* anche in substrati che ne contengono piccole quantità.

Dobbiamo comunque ritenere che la coltura di *E. histolytica* in terreno di Boeck e Drbohlav o altri simili, benchè venga comunemente eseguita senza previo riscaldamento del terreno e senza aggiunta di uno strato di olio di vaselina, sia, realtà, *una coltura anaerobica*: *E. histolytica* sviluppa, infatti, nel fondo del tubo, più lontana possibile dall'ossigeno atmosferico e le piccole quantità di ossigeno disciolte nel terreno sono utilizzate dalla flora batterica associata.

II. periodo: Coltivazione di E. histolytica *in associazione ad una sola specie batterica o ad un altro protozoo.*

Affermatosi il concetto, già espresso da BOECK e DRBOHLAV (1925) che *E. histolytica* può vivere e moltiplicarsi nei terreni colturali, anche i più adatti, solo in associazione a Schizomiceti, si è cercato di identificare, in questa seconda fase di studi, quelle specie batteriche che meglio si prestavano allo scopo.

Non vi è dubbio che si sia conseguito un notevole progresso riuscendo a coltivare *E. histolytica* in presenza di una sola specie batterica ed oggi essa viene facilmente mantenuta, in molti Laboratori di tutto il mondo, in colture monobatteriche.

Dopo i primi tentavi di CLEVELAND e SANDERS (1930), REES e coll. (1941) riuscirono ad allestire la prima coltura monobatterica di *E. histolytica*: il batterio associato era il cosidetto *"organismo t"*, originariamente designato come *Leptotrichia buccalis*, un batterio gram-negativo, sporigeno, microaerofilo, che è stato quello che ha dato i risultati più costanti e più evidenti tra i tanti finora studiati.

A seguito di tale risultato fu iniziato lo studio sistematico dell'associazione di *E. histolytica* con singole specie batteriche, sia appartenenti alla flora intestinale che aventi i più vari *habitat*.

Ci sembra utile riportare schematicamente nella tabella 2 i risultati riferiti dai vari Autori che si sono occupati dell'argomento (CLEVELAND e SANDERS, 1930; CHINN, JACOBS, REARDON e REES 1942; DOBELL, 1947; SHAFFER e FRYE, 1948; JACOBS, 1950).

Non tutte però le specie batteriche classificate come capaci di sostenere o favorire lo sviluppo di *E. histolytica*, hanno dato sempre ed in mano a tutti gli Autori risultati concordanti. Così, ad esempio, *Staph. var. aureus*, *A. aerogenes*, *P. vulgaris*, *S. paratyphi*, *B. subtilis* ed *E.coli* hanno di volta in volta permesso di registrare successi ed insuccessi.

REES e coll. tentano di spiegare tali discordanze ascrivendole a differenze esistenti tra i vari ceppi di *histolytica*, a probabili variazioni nella composizione del terreno o ad altri fattori non sempre facilmente ponderabili; così, ad esempio, ottennero buoni sviluppi di amebe con uno stipite di *E. coli*, mentre con diversi altri stipiti ciò non avvenne. In questo senso potrebbero forse essere interpretati anche i risultati ottenuti recentemente da CAPOCACCIA e CAO - PINNA (1954).

Di tutti i batteri studiati (vedi tabella 2) quelli che finora hanno dato risultati più costanti e più chiari e che vengono oggi largamente adoperati, sono: oltre il cosidetto *"organismot"*, del quale si è già parlato, *Clostridium perfringens* (CHINN, JACOBS, REARDON e REES) ed uno *streptobacillo* (probabilmente *Bacteroides sp.*) gram-negativo, anaerobio, non meglio identificato (SHAFFER e FRYE).

E' infine utile ricordare come PHILLIPS (1950) sia riuscito a coltivare *E. histolytica*, libera da batteri, in associazione con *T. cruzi*, che rappresenta a tutt'oggi il solo microrganismo non batterico adatto ad essere utilizzato dall'ameba.

La coltivazione di *E. histolytica* in presenza di una sola specie batterica, non sempre facilmente realizzabile, è stata ottenuta ricorrendo a vari metodi che possiamo così riassumere:

TABELLA 2.

Specie batteriche capaci ed incapaci di favorire lo sviluppo di E. histolytica *(forme vegetative e forme cistiche), studiate da vari autori con metodi differenti.* (Da Jacobs, 1950).

Cisti		Trofozoiti	
Specie batteriche adatte	Specie batteriche non adatte	Specie batteriche adatte	Specie batteriche non adatte
Organismo t	*Escherichia coli*	*Bacillus niger*	*Bacillus megatherium*
Clostridium perfringens	*Aerobacter aerogenes*	*B. mesentericus*	*B. cereus*
Staph. aureus	*Alcaligenes faecalis*	*Escherichia communior*	*B. subtilis*
Strept. hemolyticus	*Staph. albus*	*Vibrio comma*	*Proteus vulgaris*
Strept. faecalis	*Proteus vulgaris*	*Neisseria catarrhalis*	*Escherichia acidi-lactici*
Strept. viridans	*Brucella suis*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus subtilis	*Br. abortus*	*Klebsiella pneumoniae*	*Alcaligenes faecalis*
B. mesentericus	*Corynebacterium diphtheriae*	*Eberthella typhosa*	
Actinomyces muris	*Bacterium translucens*	*S. paratyphi A*	
Aplanobacter stewartii	*B. striafacens*	*S. paratyphi B*	
Bacterium coronofaciens	*Pseudomonas aeruginosa*		
Serratia marcescens	*Salmonella schottmuelleri*		
Neisseria catarrahalis	*Salmonella paratyphi*		

1) selezione di cisti, libere da batteri, facendo uso del micromanipolatore (Rees e coll.

2) sterilizzazione chimica delle cisti, mediante trattamento, dopo flottazione, con varie sostanze batteriche (Balamuth e Wieboldt, Rao, ecc.).

3) trattamento delle colture con antibiotici (penicillina e streptomicina) e aggiunta di un batterio antibiotico-resistente (Jacobs, Nakamura, Shaffer e Frye, ecc.).

4) inoculazione di trofozoiti provenienti da ascessi epatici, batteriologicamente sterili (Cleveland e Sanders, Friedrichs e Harris ecc.).

5) inoculazione di trofozoiti da colture con *T. cruzi*, che muore a seguito delle nuove condizioni colturali.

E' bene precisare che nessuno di questi metodi garantisce la uccisione del 100% dei batteri, tanto che alcuni Autori (Miller e Firbotte, 1948) hanno preferito adoperarne diversi associati; possiamo comunque convenire che mettendo in atto il trattamento delle cisti con sostanze chimiche o con antibiotici si possono ottenere risultati soddisfacenti.

Balamuth e Wieboldt, adoperando il sublimato (soluzione 1/50.000) per 90 min. a 4° C, riferiscono di avere avuto risultati migliori di quelli ottenuti con l'uso del micromanipolatore; Rao ha adoperato una combinazione di acido cloridrico (N / 20), di sublimato (0,002%) e di permanganato di potassio (0,02%); Dobell e Neal l'acriflavina (0,1%). Le cisti sono in genere più resistenti dei batteri a queste sostanze: si deve però ricordare che se ciò è vero per gli aerobi, lo stesso non può dirsi purtroppo per gli anaerobi sporigeni, che possono alle volte essere presenti nelle culture. Dobell ha ottenuto la eliminazione di quest'ultimi mediante coltivazione in terreni addizionati di violetto di genziana.

III periodo: Coltivazione di E. histolytica *in coltura pura.*

Lo studio delle associazioni di *E. histolytica* con singole specie batteriche o con *T.cruzi*, ha suscitato notevole interesse, dato che ove si riuscisse ad isolare e ad identificare le sostanze fornite dai batteri o prodotte dal metabolismo, capaci di promuovere lo sviluppo di *E. histolytica*, potremmo ottenere questo protozoo in cultura pura.

Siamo così giunti alla terza fase delle indagini, la più recente e certamente la più interessante: benchè i tentativi sino ad ora compiuti non siano esenti da critica e si possano considerare praticamente falliti, nulla vieta di sperare che proseguendo su questa via si possa finalmente arrivare alla meta tanto agognata.

Il problema relativo al meccanismo con il quale i batteri promuovono lo sviluppo e la moltiplicazione di *E. histolytica* è stata affrontato da numerosi Autori e sono state emesse all'uopo varie ipotesi, che qui cerchiamo di riassumere brevemente:

1) la flora batterica fornisce all'ameba adatte condizioni anaerobiche, riducendo il potenziale di ossido - riduzione del terreno (BALAMUTH e HOWARD, BRADIN e HANSEN, CHANG, HOPKINS e WARNER, NAKAMURA, SHAFFER e coll., ecc.).

2) la flora batterica fornisce all'ameba i prodotti del suo metabolismo (BALAMUTH e HOWARD, CHANG, NAKAMURA, REES e coll., ecc.).

la flora batterica fornisce all'ameba sistemi enzimatici, necessari per l'utilizzazione delle sostanze nutritizie contenute nel terreno.

4) la flora batterica costituisce per se stessa alimento indispensabile per l'ameba.

La prima ipotesi è facilmente criticabile: se, infatti, la flora batterica fosse utile solo a mantenere il potenziale di ossido - riduzione adatto allo sviluppo di *E. histolytica* l'aggiunta ai terreni di sostanze riducenti o di sostanze capaci d'impedire l'accesso dell'ossigeno atmosferico nel terreno, dovrebbe raggiungere lo stesso scopo. D'altra parte molte specie batteriche anaerobie, incapaci a mantenere potenzali ridotti, vengono usate con successo per la coltivazione del protozoo.

Dobbiamo pertanto ritenere che la flora batterica non è necessaria allo sviluppo e alla moltiplicazione di *E. histolytica* solo in quanto fornisce ad essa le adatte condizioni anaerobiche; è utile però ricordare che tale meccanismo ha indubbiamente la sua importanza, anche se accessoria, e che, pertanto, non deve essere misconosciuto allorquando ci si accinge alla coltivazione dell'ameba, libera da batteri.

Le altre ipotesi sono invece molto più suggestive, anche se di gran lunga più difficili a suffragare con prove sperimentali definitive.

L'apporto all'ameba da parte dei batteri di sostanze prodotte dal loro metabolismo (II ipotesi) o di sistemi enzimatici atti alla scomposizione delle sostanze nutritizie contenute nei terreni (III ipotesi) presuppone la completa vitalità e la piena attività metabolizzante della flora batterica associata, mentre la quarta ipotesi, basata sul fatto che la cellula batterica potrebbe costituire, per sè stessa o per qualche suo componente protoplasmatico, alimento indispensabile all'ameba, esclude la vitalità della cellula, giacchè in tal caso anche batteri morti potrebbero fornire le sotanze, atte allo sviluppo dell'ameba.

Si delinea quindi un problema di fondamentale importanza: *può* E. histolytica *vivere e moltiplicarsi in presenza di cellule batteriche morte o necessita di batteri vivi e attivamente metabolizzanti?*

Sino a qualche anno addietro era generale convincimento che solo i batteri vivi e vitali fossero capaci di promuovere la moltiplicazione di *E. histolytica;* in epoca più recente, però, diversi tentativi sperimentali tenderebbero a dimostrare che essa può continuare a vivere in presenza di cellule batteriche morte.

JACOBS (1947), per primo, ha dimostrato che *E.histolytica* può svilupparsi per 24-48 ore, allorquando viene trapiantata in terreni contenenti cellule batteriche morte(*E. coli* e *Staph. aureus*) e penicillina e in due casi è riuscito a portare avanti le culture per alcuni mesi.

SHAFFER (1952), a conclusione di sue precedenti ricerche in collaborazione con FRYE (1947), con WALTON e FRYE (1947) e con RYDEN e FRYE (1948) afferma che *E. hi-*

stolytica può vivere e moltiplicarsi in un terreno liquido al tioglicollato (terreno S.F.), addizionato di amido di riso e penicillina, nel quale è stato coltivato prima per 24 ore uno streptobacillo anaerobio, allontanato poi per centrifugazione. Avendo notato che nei tubi di terreno S. F., non ancora inoculati con l'ameba, si forma, dopo 24-48 ore d'incubazione a 37° C., un sedimento fioccoso, che aggiunto al terreno suddetto, è capace di promuovere la moltiplicazione di *E. histolytica*, detto Autore sarebbe portato ad affermare che lo sviluppo e la moltiplicazione dell'ameba nel terreno S. F. sono legati a una sostanza corpuscolata, rappresentata, con tutta probabilità, dalla cellula batterica o da qualche parte di essa.

KARLSSON e coll. (1952) avrebbero dimostrato che lo streptobacillo anaerobio, già ricordato nei lavori di SHAFFER, contiene un fattore di crescita (*E. h. factor*) necessario alla vita dell'ameba, che lo può utilizzare solo dopo ingestione del batterio. Tale fattore sarebbe, secondo KARLSSON, piuttosto labile al calore (si attenua con l'esposizione dei batteri a 100° C. e viene distrutto ai 121° C), agli alcali (viene inattivato in 5 min. da una soluzione 0,1 N. di NaOH) ed alla ossidazione, resiste all'azione della formaldeide, non è estraibile mediante i più comuni solventi (alcool, etere, acetone). Detto Autore ha coltivato pertanto *E. histolytica* in terreno di Hansen, addizionato di una cultura di streptobacillo uccisa col formolo (4%), che viene poi allontanato mediante centrifugazione e ripetuti lavaggi con acqua distillata. Il terreno in parola veniva inoltre addizionato di bacitricina e aureomicina o di penicillina e streptomicina per inibire lo sviluppo dell'*organismo t*, associato al ceppo di ameba usato per queste prove.

SAITO (1953) riporta un metodo da lui escogitato con successo per coltivare *E. histolytica* in assenza di batteri viventi: l'ameba viene coltivata nel suo terreno (R.S.R.: parte solida = siero di cavallo più liquido di Ringer; parte liquida = liquido di Ringer) o in quello di Balamuth, già prima insemenzati con la flora batterica associata, esposta, dopo 24 ore d'incubazione, alla temperatura di 56° - 58° C per due ore e contenenti al solito, penicillina e streptomicina. Con tale metodica detto Autore ha provato a coltivare *E. histolytica* in terreni insemenzati con le seguenti specie batteriche: *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *B coli*, *B. alkaligenes*, *C. tetani C. welchii*, ottenendo i risultati seguenti: *B. coli* e *B. alkaligenes* promuovono lo sviluppo dell'ameba nella prima coltura ma non altrettanto nelle subcolture successive; *Streptococcus*, *Staphilococcus* e *C. tetani* non hanno alcun effetto stimolante sulla crescita dell'ameba, ma quando quest'ultimo viene associato al *B. coli* le amebe si sviluppano anche in diverse subcolture successive; *C. welchii* permette, infine, un rigoglioso sviluppo di amebe per un numero indefinito di subcolture

Sembrerebbe pertanto dai lavori su riportati che *E. histolytica* possa vivere in presenza di cellule batteriche morte, ma un attento esame critico delle metodiche adoperate e in modo particolare delle temperature usate per uccidere i batteri (56° - 60°C nelle prove di JACOBS; 56° - 58° C in quelle di SAITO) non ci permette di sottoscrivere tale affermazione.

Lo stesso JACOBS riconosce che con il metodo da lui adoperato non si ottiene l'uccisione totale dei batteri e SHAFFER ammette che nel liquido culturale, centrifugato per allontanare lo streptobacillo sviluppatosi nelle 24 ore d'incubazione, rimangono da 40 a 70 milioni di batteri per 1 cc., anche se l'aggiunta di penicillina al terreno sembri inibire una loro ulteriore moltiplicazione.

Nè a minori critiche si sottraggono le prove di SAITO, che usa le temperatura di 56° - 58° C per uccidere i batteri adoperati nelle sue prove, tra i quali *C. welchii!*

Riteniamo perciò di poter affermare che non esiste, a tutt'oggi, una prova convincente ed esente da critiche, che dimostri la capacità di *E. histolytica* a vivere solo in presenza di cellule batteriche morte e convalidi pertanto la ipotesi che i batteri forniscono all'ameba sostanze, non ancora identificate (*E. h. factor?*), contenute nel loro protoplasma. Non si può, infatti, parlare di culture libere da batteri, fintantochè nei terreni culturali sono presenti anche poche unità batteriche vive e vitali, capaci, quindi, di fornire eventuali prodotti del loro metabolismo o eventuali sistemi enzimatici alle amebe.

Istruttive al riguardo le esperienze di NAKAMURA e ANDERSON su *T. cruzi*: detti Autori hanno dimostrato che *E. histolytica* vive con tale protozoo anche quando questi è esposto alla temperatura di 48° C per 10 min., trattamento che solo apparentemente uccide i tripanosomi, giacchè, in realtà ne paralizza solo i movimenti, mentre i meccanismi respiratori funzionano regolarmente. Se invece *T.cruzi* è esposto alla temperatura di 50° C per 10' non promuove più lo sviluppo di *E. histolytica*, dato che con questo trattamento esso è realmente ucciso.

Particolare menzione meritano poi i risultati ottenuti in epoca recente (1952-1953) da SHAFFER e SIECKICWICZ e da SADUN, KRUPP ed EVERITT: i primi coltivano *E. histolytica*, in anaerobiosi in un liquido nutritivo per culture di tessuti addizionato di tessuto embrionale di pollo; i secondi lo coltivano, sempre in anaerobiosi, in liquido amniotico e allantoideo di embrione di pollo di 9-13 giorni di sviluppo.

Del pari interessanti i risultati di LAMY (1948) che è riuscito a coltivare, mediante l'uso del micromanipolatore, *E. invadens* nel terreno di Dischiens, con ogni probabilità privo di batteri, contenente tessuto embrionale di pollo e piccoli frammenti di fegato fresco di vipera, prelevato sterilmente.

Volendo trarre le conclusioni da quanto abbiamo esposto, cercando di riassumere la mole non indifferente di lavori sull'argomento, si può affermare che la coltivazione di *E. histolytica* è uscita dall'empirismo dei primi tempi e procede, anche se tra difficoltà non lievi, verso la meta ultima tanto auspicata da tutti coloro che si occupano dell'argomento: l'ottenimento, cioè, di culture pure, prive di microorganismi associati.

Allo stato attuale tale meta non è stata ancora raggiunta e, come si è detto, tutte le prove tendenti a dimostrare che *E. histolytica* può vivere in assenza di batteri o in presenza di cellule batteriche morte, non sono esenti da critiche e vanno accolte con le dovute riserve.

A noi sembra più prudente restare ancora al vecchio concetto che, cioè, *E. histolytica* può svilupparsi, moltiplicarsi e propagarsi in modo indefinito in successivi trapianti solo in associazione a batteri viventi; sappiamo oggi in modo abbastanza preciso quali sono le specie batteriche più particolarmente atte a ciò: *organismo t, streptobacillo anaerobio, C. welchii.*

La ricerca di altre specie batteriche capaci di promuovere in modo altrettanto costante lo sviluppo di *E. histolytica* e lo studio sopratutto degli eventuali prodotti del metabolismo o degli eventuali sistemi enzimatici forniti da dette specie all'ameba, potranno essere fecondi di risultati atti a risolvere l'annoso problema.

Detti studi, che rivestono difficoltà non indifferenti, cominciano ad essere affrontati: così NAKAMURA (1952) ha tentato la sostituzione di *T. cruzi* con un sistema enzimatico e BRADNER (1953) ha iniziato lo studio della fisiologia delle specie batteriche che, a suo avviso, promuovono lo sviluppo di *E. histolytica*, dimostrando che nessuna di esse è capace di fermentare l'adonite e la dulcite e di produrre indolo e acetilmetilcarbinolo.

E' auspicabile che tali ricerche siano proseguite e approfondite, giacchè potranno concorrere alla conoscenza di ciò che i batteri forniscono all'ameba per il suo sviluppo.

Per nostro conto da tempo abbiamo iniziato una serie sistematica di studi in merito e i risultati che esponiamo in questa nota costituiscono una prima parte delle numerose osservazioni raccolte.

* * *

Nell'intento di contribuire ad una più precisa conoscenza sia delle specie batteriche che favoriscono lo sviluppo di *E. histolytica* nei terreni culturali, sia delle condizioni nelle quali tale sviluppo e mantenimento in coltura si realizzano, abbiamo intrapreso ricerche sistematiche su stipiti autoctoni del parassita.

Già in una precedente nota a carattere preventivo abbiamo riferito alcuni dati che trovano in questa nota una più ampia esposizione.

Inizialmente, allorchè non possedevamo ancora *l'organismo t*, facemmo dei tentativi sistematici di coltivazione del protozoo dalle feci ottenute dopo purgante salino sia da soggetti malati che da portatori, aggiungendo al terreno culturale penicillina e streptomicina o lasciando senza trattamento con antibiotici la flora batterica presente nelle feci.

In un secondo tempo, ottenuto dalla cortesia del Dr. Rees del N.I.H. di Bethesda sia una coltura pura dell'*organismo t* che tre stipiti di *E. histolitica* da tempo coltivati con questo batterio nei laboratori americani (stipite n. 200, n. 103 e F 22), proseguimmo i nostri tentativi di coltivazione anche in presenza di detto organismo, utilizzando feci ricche di trofozoiti e cisti ottenute per flottazione da feci normalmente emesse.

Materiali e metodi usati

Terreni colturali: numerosi furono i terreni colturali usati nei primi tentativi di coltivazione di *E. histolytica* dalle feci e precisamente il terreno di Boeck-Drohblav modificato, di Deschiens, di Cleveland e Collier, di Balamuth e Sandza modificato e di Inoki al sangue intero (terreno n. 1).

Tra tutti questi i migliori risultati furono però ottenuti con il terreno di Boeck-Drohblav modificato e in parte anche con quello di Inoki. Gli altri tre mezzi colturali si dimostrarono nelle nostre mani inadatti ad un facile e sicuro ottenimento di colture di *E. histolytica* dato che solitamente si aveva un rapido prevalere o di *Blastocystis hominis* o della comune flora batterica intestinale, talchè in breve volger di tempo i trofozoiti che talvolta erano riusciti a moltiplicarsi venivano sopraffatti.

Tra i due terreni che nelle prove iniziali avevano dato risultati migliori, demmo la preferenza, per un uso routinario continuativo, a quello di Boeck-Drohblav modificato, anche per la sua semplicità e facilità di preparazione, fattori che fanno sì che esso sia largamente impiegato in molti laboratori che si occupano dell'argomento.

La preparazione del terreno è la seguente:

Parte solida: 4 uova intere + cc. 50 di liquido di Locke modificato vengono versate in un pallone sterile, contenente palline di vetro. Si agita fino alla completa emulsione e si distribuisce in tubi (160 per 16 mm.) in quantità tale da avere un becco di clarino alto cm. 5. Si lascia riposare il terreno per due ore a t.a., in modo che possono liberarsi le bollicine di aria in esso formatesi con l'agitazione, indi si coagula a 80° C per 20 min.

Parte liquida: Liquido di Locke modificato: NaCl g. 8, $CaCl_2 . 2H_2O$ g. 0,2, KCl g. 02, $MgCl_2 . 6H_2O$ g. 0,01, Na_2HPO_4 g. 2, $NaHCO_3$ g. 04, KH_2PO_4 g. 0,3, H_2O distillata cc. 1000. Si sciolgono le sostanze nell'ordine, si pone la soluzione a vapore fluente per 20 min. e si filtra per Seitz dopo raffreddamento a t.a.

La parte liquida viene aggiunta sterilmente al tubo contenente la parte solidificata

a becco di clarino in modo da ricoprire questo quasi interamente e il terreno viene sterilizzato. Anzichè la sterilizzazione in autoclave a 121° C per 15 min., abbiamo preferito la tindalizzazione a 80° C per 30 min., per 3 giorni successivi.

Prima dell'uso il terreno viene addizionato di polvere di riso, sterilizzata in stufa a secco, a 160° C per 60 min. (versata con un dispositivo molto semplice e pratico in uso presso il N.I.H. di Bethesda) e tenuto a 1 ora a 37° C.

Le subculture venivano eseguite ogni 48-72 ore, prelevando con pipetta Pasteur sterile a punta affilata qualche goccia di sedimento dalla coltura vecchia e portandola nel fondo del tubo nuovo.

* * *

Dopo un certo numero di tentativi infruttuosi, riuscimmo nel settembre 1953 ad ottenere, su terreno di B. - D. modificato, una coltura di *E. histolytica* da feci particolarmente ricche di trofozoiti tipici, appartenenti al soggetto N. N. P. di Pisa, che aveva contratto l'infezione nel 1942 a Porto S. Stefano (Grosseto), ove prestava servizio militare. Il paziente soffriva di una forma cronicizzata con periodi di stipsi alternati a periodi di diarrea (da 3 a 20 scariche diarroiche muco-sanguinolente al dì).

In questo caso le colture apparvero, fin dall'inizio ricche di amebe vive e vitali e capaci di riprodursi attivamente in successivi trapianti fatti, come di norma, ogni 48 ore. Nei precedenti tentativi invece il protozoo era scomparso dai tubi di coltura dopo la prima o al massimo la seconda generazione.

Ritenemmo perciò interessante studiare la flora batterica associata: le semine sul brodo-tioglicollato, agar-sangue, agar-lattosato al bleu di bromotimolo (Wurtz) e brodo-bile verde brillante dimostrarono: assenza di anaerobi, presenza di *E.coli* e di *Ps.aeruginosa* (*). Mentre questa specie era assolutamente predominante, talchè le selezioni su piastre di agar mettevano in evidenza una coltura pura di colonie, la presenza del colonbatterio era svelabile solo ricorrendo alla semina di una discreta quantità del terreno di B.-D. in brodo-bile-verde brillante.

C'era apparso pertanto molto verosimile che il successo dell'ottenimento in coltura del ceppo N.N.P. e del suo perfetto mantenimento nei trapianti successivi (ormai è passato più di un anno) fosse da ascrivere alla associazione con *Ps.aeruginosa.*

La conferma a tale nostra supposizione ci fu subito data dalla coltivazione di un secondo stipite (P.P.G.), ottenuto nel febbraio 1954, dalle feci da purga di un malato, dimorante in Pisa, venuto alla nostra osservazione per una sindrome colitica, ad etiologia non ben chiara, datante da diversi mesi.

Il successo della coltura ci indusse all'esame della flora batterica ed anche

(*) La diagnosi di specie ci fu confermata dal Prof. J. G. Marchal, Direttore del Laboratorio di Microbiologia della Facoltà di Farmacia di Nancy, al quale inviammo in esame la coltura e che qui teniamo a ringraziare vivamente.

in questo caso mettemmo in evidenza *Ps. aeruginosa,* associato ad un colonbatterio classificabile come *E.coli* e svelabile solo con il terreno di arricchimento (B.B.V.B.).

Sia nell'un caso che nell'altro vennero fatti numerosi tentativi di eliminare le minime quantità di *E.coli* presenti, aggiungendo al terreno colturale dosi di cloroamfenicolo (*) non dannose nè al *piocianeo* nè all'ameba, ma tali tentativi risultarono infruttuosi.

Malgrado ciò è però nostro convincimento che il successo dell'isolamento e del mantenimento in coltura dei nostri due stipiti di *E.histolytica* N.N.P. e P.P.G. debba essere ascritto alla associazione con *Ps.aeruginosa.*

Questa specie batterica allor che prende rapidamente il sopravvento nelle colture elimina quasi completamente gli altri componenti della flora batterica intestinale ed ostacola in maniera evidente la moltiplicazione di *Blastocystis hominis,* che, come già abbiamo detto all'inizio, spesse volte invade tumultuosamente le colture sopraffacendo *E.histolytica.*

Questo nostro convincimento circa la importanza di *Ps.aeruginosa* per il successo dell'isolamento iniziale dalle feci di stipiti di *E.histolytica* e per il loro mantenimento in coltura ci è stato pienamente confermato dai risultati ottenuti successivamente. Infatti nel maggio 1954 dalle feci da purga di un soggetto (Flavio)), portatore asintomatico, venne coltivato uno stipite di *E.histolytica* che fin dall'inizio si presentò associato esclusivamente con un bacillo anaerobio, gram.positivo, non bene identificato. Dato che in 2-3 passaggi successivi si assisteva ad una diminuzione della vitalità dell'ameba, tanto che la coltura minacciava di esaurirsi, addizionammo al terreno di coltura della penicillina (5.000 U. per cc.) allo scopo di eliminare l'anaerobio e contemporaneamente insemenzammo nelle colture il ceppo di *Ps.aeruginosa,* isolato dal precedente caso N.N.P.

L'aggiunta dell'antibiotico non riuscì ad eliminare completamente il bacillo anaerobio ed è ancora possibile rintracciarlo ricorrendo ad abbondanti semine in brodo al tioglicollato, mentre il *piocianeo* si sviluppa regolarmente e la sua presenza ha permesso il mantenimento in coltura del ceppo, il quale si presenta pienamente vitale ormai a distanza di 3 mesi dall'isolamento.

Questi tre stipiti da noi coltivati in associazione con *Ps.aeruginosa* conservano a tutt'oggi i caratteri tipici della specie: notevole mobilità, ectoplasma ben differenziato, nucleo scarsamente visibile a fresco e con caratteri tipici nei preparati colorati.

Nel terreno di B.-D. i trofozoiti presentano una attiva fagocitosi verso i granuli di riso. Qualora al posto della polvere di riso si aggiungano al terreno globuli rossi umani lavati si osserva che, dopo 12 ore, numerose amebe hanno inglobato da 1 a 5 emazie. Questa proprietà ematofaga se, da un lato, conferma

(*) La prova della sensibilità *in vitro* ai vari antibiotici aveva mostrato la particolare sensibilità al CAF dei nostri ceppi di *E. coli.*

la vitalità dei trofozoiti coltivati in associazione con il *piocianeo,* dall'altro ci dimostra come essi abbiano conservato, anche nelle colture, una caratteristica tipica della specie, che non si osserva frequentemente nelle forme croniche dei nostri climi.

Di contro a questi brillanti risultati dovemmo invece registrare degli insuccessi allorchè nelle colture, ottenute da feci da purga, prendevano rapidamente il sopravvento i colonbatteri.

Così, ad esempio, per il caso R.P. le feci furono seminate contemporaneamente in tubi di terreno di Boeck modificato semplice e in tubi dello stesso terreno nel quale erano stati fatti sviluppare per 24 ore rispettivamente o l'*organismo t* o lo *Ps. aeruginosa.* Le amebe si esaurirono completamente nello spazio di tre generazioni: lo studio della flora batterica associata dimostrò prevalenza di *E.coli* e di colonbatteri atipici, lenti fermentatori del lattosio.

Risultati analoghi si ebbero in altri tre casi (Cenaia, R.G., R.A.), nei quali lo flora batterica associata era rappresentata prevalentemente da *E.coli,* che aveva preso il sopravvento su *Ps. aeruginosa,* successivamente aggiunto.

Sulla base dei risultati ottenuti ci sembra, pertanto, di poter affermare che Ps. aeruginosa *favorisce lo sviluppo di* E.h., *mentre* E.coli *lo ostacola, quando addirittura non lo impedisce.*

La incapacità di *E.coli* a promuovere e mantenere la coltivazione di *E.h.* trova conferma anche nelle recenti ricerche di ALLEGRA e NIUTTA (1953) che, studiando l'influenza di alcuni batteri della flora intestinale sulla coltivabilità di *E.histolytica,* arrivano alla conclusione che molte delle difficoltà che si incontrano per ottenere buone colture del protozoo sono ascrivibili all'azione sfavorevole dei colonbatteri.

I buoni risultati da noi ottenuti, utilizzando come germe associato *Ps. aeruginosa* sembrano essere in disaccordo con quegli ottenuti dagli Autori (*) (vedi tabella 2) che considerano tale batterio come inadatto a permettere lo sviluppo dell'ameba.

A nostro avviso tale disaccordo è con ogni probabilità da ascriversi al fatto che i succitati Autori hanno utilizzato per le loro prove stipiti già da lungo tempo mantenuti in coltura ed abituati all'associazione con una determinata specie batterica. Questa, veniva eliminata a mezzo del trattamento con antibiotici e sostituita con la specie da studiare. Così, ad esempio, nei lavori di JACOBS il ceppo N.R.S. di *E.histolytica,* abitualmente associato con uno *streptococco emolitico,* veniva privato, mediante penicillina, di detto germe e messo in contatto

---

(*) Dalla recensione di un lavoro di SAITO del 1953, apparsa nel *Trop. Diseases Bull.* Maggio 1954, in epoca, cioè, posteriore alla pubblicazione della nostra nota preventiva, sembrerebbe che detto Autore sia riuscito, partendo da cisti libere da batteri, a coltivare *E. histolytica* in terreni, già insemenzati precedentemente (24 ore di incubazione a 37° C) con *Ps. aeruginosa.*

con altre specie penicillino-resistenti (*S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. enteritidis, K. pneumoniae, Ps.aeruginosa, Sh. dysenteriae, Pr.vulgaris* OX 19).

Tale ipotesi potrebbe del resto essere suffragata dal fatto che i tentativi da noi eseguiti con gli stipiti americani di *E. histolytica* n° 103 e F22 per sostituire l'*organismo t,* presente nelle loro colture, con il nostro stipite di *Ps.aeruginosa* ebbero invariabilmente come risultato l'esaurimento più o meno rapido delle colture. E' da tener presente che il *piocianeo* esplica una netta azione antibiotica sull'*organismo t.*

Non può d'altro lato escludersi la possibilità di un diverso comportamento tra i vari stipiti di *E. histolytica,* fenomeno questo non messo in evidenza da coloro che hanno usato per le loro prove un solo stipite (n° 101 nelle prove di Chinn e coll., NRS in quelle di Jacobs), ma che è invece apparso a noi abbastanza chiaramente eseguendo tentativi di excistamento e mantenimento in coltura su vari stipiti ottenuti direttamente dalle feci di pazienti diversi.

Così, ad esempio, nel caso del portatore asintomatico K. P., le cisti, raccolte per flottazione da feci normalmente emesse, e opportunamente sterilizzate, si excistarono sia in presenza di *organismo t* che del ceppo N.N.P. di *Ps.aeruginosa.* Mentre, però, le colture con *organismo t* furono fin dall'inizio rigogliose e furono mantenute con successivi trapianti ogni 48-72 ore per oltre 6 mesi, le colture con il *piocianeo* apparvero fin dall'inizio meno vitali e si esaurirono nello spazio di 30 giorni (15 trapianti).

Risultati analoghi si ebbero con altri tre ceppi di *E.histolytica*: due provenienti da soggetti portatori asintomatici (G.M., C.M.R.) ed uno da un malato affetto da una forma cronicizzata (Pistoia). Si trattava però in questi casi di « *razze piccole* » ed è ben noto come la coltivazione di queste sia oltremodo difficile e riesca solo eccezionalmente (Sapero e coll.).

Che del resto possano esistere notevoli differenze di capacità moltiplicativa da stipite a stipite di *E. histolytica* è dimostrato dai lavori di Shaffer che, adoperando lo stesso terreno, lo stesso batterio associato e la medesima tecnica di inoculazione, ottenne col ceppo NIH 200 un numero di 20.000-40.000 amebe per cc., con l'F22 15.000-30.000 per cc. e con il ceppo Luna 10.000-12.000 per cc.

A parte però tali differenze di comportamento legate a fattori propri del protozoo e per ora difficilmente spiegabili, ci sembra di poter affermare, sulla base della nostra esperienza, che gli insuccessi osservati talvolta nella coltivazione di *E.histolytica* in associazione con *Ps.aeruginosa* siano prevalentemente da imputare all'antagonismo esercitato da *E.coli.*

In tutti quei casi, infatti, (R.P., Cenaia, R.G., R.A.) nei quali la flora intestinale associata era rappresentata prevalentemente da *E.coli* e questi prese il sopravvento su *Ps.aeruginosa* si ebbe la rapida negativizzazione delle colture. Pieno successo fu ottenuto, invece, allorchè i colonbatteri presenti nelle

colture erano così scarsi da essere svelabili solo usando dei terreni di arricchimento (vedi stipiti N.N.P. e P.P.G.).

Considerazioni e conclusioni

Dall'insieme dei risultati sopra riferiti ottenuti da una larga serie di osservazioni condotte per circa due anni su numerosi stipiti di *E.histolytica*, coltivati da soggetti malati o portatori asintomatici che avevano contratto la infezione nelle nostre zone, è possibile trarre le seguenti conclusioni fondamentali:

1) *Ps.aeruginosa* è una specia batterica capace di favorire lo sviluppo e il mantenimento in coltura di ceppi di *E.histolytica*, di recente isolamento dalle feci, e di permetterne l'excistamento.

2) Non tutti gli stipiti di *E.histolytica* appaiono capaci di sopravvivere all'associazione in coltura con *Ps.aeruginosa*.

Questo fenomeno è particolarmente evidente per gli stipiti già da lungo tempo coltivati in associazione con *organismo t*, quali quelli americani n° 103 e F22; ma può anche verificarsi con ceppi di recente isolamento.

3) *E.coli* si è dimostrato, in tutte le nostre prove, inadatto a promuovere e a sostenere da solo lo sviluppo e il mantenimento in colture di *E.histolytica*. Molti degli insuccessi nella coltivazione di questa dalle feci sono ascrivibili al sopravvento preso da tale specie batterica nel terreno colturale. Solo quando *E.coli* è presente in minime quantità ed in associazione con *Ps.aeruginosa* non danneggia il protozoo.

Non è facile dare una spiegazione dei fenomeni sopra riferiti; essi, però, mentre aprono la via ad ulteriori indagini, contribuiscono a sempre meglio conoscere la complessa biologia di *E.histolytica*.

Riassunto

Gli AA., dopo un accurato esame critico del problema della coltivazione di *E. histolytica*, riferiscono sugli studi da loro fatti circa le specie batteriche capaci di promuovere lo sviluppo nei terreni culturali di detto protozoo.

Dimostrano come *Ps. aeruginosa*, contrariamente a quanto affermato da altri ricercatori, consenta la coltivazione di alcuni stipiti di *E. histolytica*.

Tale coltivazione sembra essere, invece, notevolmente ostacolata da *E. coli*.

Summary

The authors review the problem of *E. histolytica* cultures and report on their research on bacteria species enhancing the growth of *E. histolytica* in culture media. The authors, contrary to the opinion of different workers, prove that *Ps. aeruginosa* makes possible the growth of some strains of *E. histolytica*. Such a growth seems, however, to be considerably hindered by *E.coli*.

BIBLIOGRAFIA

ALLEGRA G., NIUTTA R. (1953): Studi sulla influenza negativa di alcuni germi della flora batterica intestinale nella coltivazione di *E. histolytica*. *Giorn. Mal. Inf. Parass. 5*, 406.

ANDREWS J., JOHNSON C. M., SCHWARTZ S. C. - The use of fecal extracts in the cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med., 13*, 591.

AYADI M. S., ELKORDY M. I. (1946): Cultivation of. *E. histolytica* in hydatid scolices extract. *J. Roy. Egypt. Med. Ass. 29*, 214.

BALAMUTH W. (1946): Improved egg yolk infusion for cultivation of *E. histolytica* and other intestinal protozoa. *Am. Clin. Path. 16*, 380.

BALAMUTH W., SANDZA J. G. (1944): Simple, standardized culture medium for physiological studies on *E. histolytica*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 57*, 161.

BALAMUTH W., HOWARD B. (1946): Biological studies on *E. histolytica*. I. The growth cycle of populations in a mixed bacterial flora. *Am. J. Trop. Med., 26*, 771.

BALAMUTH W., WIEBOLDT M. L. (1947): Comparative growth rates of *E. histolytica* in the presence of different bacteria. *Anat. Record., 99*, 683.

BOECK W. C., DRBOHLAV J. (1925): The cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Hyg. 5*, 371.

BRANDIN J. L. JR., HANSEN E. L. (1950): Indirect *in vitro* action of antibiotics in comparison wth activity of accepted amebacides. *Am. J. Trop. Med., 30*, 27.

BRADNER W. T. (1953): A study of the physiology of bacteria which support the growth of *E. histolytica in vitro*. *J. Parasitol., 39*, 326.

VON BRAND T., REES C. W., JACOBS L., REARDON L. V. (1943): Studies on reducing substances and gas formation in cultures of *E. histolytica* and a single species of symbiotic bacteria. *Am. J. Hyg., 37*, 310.

VON BRAND T., REES C. W., REARDON L. V., SIMPSON W. F. (1943): Chemical studies on egg white medium for the cultivation of *E. histolytica*. *J. Parasitol., 32*, 190.

BUONOMINI G., BRACCINI L. (1952): Su la diagnosi parassitologica di Amebiasi. Nota I. Due utili tecniche per la ricerca delle cisti nelle feci. *Riv. It. d'Igiene, 12*, 256.

BUONOMINI G., BRACCINI L. (1954): Su la diagnosi parassitologica di Amebiasi Nota II. Proposta di uno schema di indagini ai fini di una corretta diagnosi di *E. histolytica*, *Riv. It. d'Igiene, 14*, 6.

BUONOMINI G., DE BLASI R., BARGHINI G., RICCIARDI M. L. (1954): Sulla coltivazione di stipiti autoctoni di *E. histolytica*. *Boll. Soc. Med. Chir. di Pisa, 22*, 349.

CAPOCACCIA L., CAO-PINNA M. (1954): La coltivazione della *Entamoeba histolytica* in presenza di due sole specie batteriche. *Arch. It. Sc. Med. Trop. e Parass., 35*, 55.

CHANG S. L. (1946): Studies on *E. histolytica*. I. Effect of hydrogen - ion concentration on encystation of *E. histolytica* in culture. *Am. J. Trop. Med., 26*, 771.

CHANG S. L. Studies on *E. histolytica*. IV. The relation of oxidation - reduction potentials to the growth, encystation and excystation of *E. histolytica* in culture. *Parasitology, 37*, 101.

CHINN B. D., JACOBS L., REARDON L. V., REES C. W. (1942): The influence of the bacterial flora on the cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med., 22*, 137.

CLEVELAND L. R., COLLIER J. (1930): Various improvements in the cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Hyg., 12*, 606.

CLEVELAND L. R., SANDERS E. P. (1930): The production of bacteria - free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. *Science, 72*, 149.

CRAIG G. M. (1936): A modification of Cleveland's medium for *E. histolytica Arch. Protistenk, 87*, 296.

CUTLER D. W. (1918): A method for the cultivation of *E. histolytica*. *J. Path. Bact., 22*, 22.

DE - LAMATER J. N., HALLMAN F. A. (1947): Studies on the culture of *E. histolytica Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 65*, 26.

DESCHIENS R. (1927): Recherches sur la culture d'*E. dysenteriae*. Modification du milieu et de la technique de Boeck-Drbohlav. *C. R. Soc. Biol.*, *96*, 1356.

DESCHIENS R. (1929): Recherches sur la culture d'*E. dysenteriae* (pH, evolution, chimique, simplification). *C. R. Soc. Biol.*, *101*, 665.

DOBELL C., LAIDLAW P. P. (1926): On the cultivation of *E. histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology*, *18*, 283.

DOBELL C. (1947): An improved method for testing the action of emetine and other chemicals on *E. histolytica*. *Ann. Soc. Belge med. trop.* (*Liber jubilaris J. Rodhlain*), *27* (suppl.), 201.

DOBELL C., NEAL R. A. (1950): Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. XII. Bacterial factors influencing the life history of *E. histolytica* in cultures. Edited by C. A. Hoare, Wellcome Laboratories of. Tropical Medicine, London.

DOPTER C., DESCHIENS R. (1938): Action de la bilirubine et de la bile totale sur le amibes dysentériques. *C. R. Soc. Biol.*, *129*, 626.

DOPTER C., DESCHIENS R. (1938): Action des sels biliaires et du cholestérol sur la cultures d'amibes dysentériques. *C. R. Soc. Biol.*, *129*, 628.

EL KORDY M. I. (1944): On the cultivation of *E. histolytica* in hydatid fluid. *J. Roy Egypt. Med. Ass.*, *27*, 329.

FRIEDRICHS A. V., HARRIS W. H. (1929): Cultivation of *E. histolytica* from a hepatic abscess. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, *27*, 90.

FRYE W. W., GABALDON A., MELENEY H. E. (1937): The production of amoebic liver abscesses in cats through the portal circulation. *J. Parasitol.*, *23*, 229.

FRYE W. W., MELENEY H. E. (1939): Liver extract as a substitute for serum in the culture medium for *E. histolytica*. *Science*, *89*, 564.

GRIFFIN A. M., MC CARTEN W. G. (1949): Sterols and fatty acids in the nutrition of entozoic amoebae in cultures. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, *72*, 645.

GRIFFIN A. M., MC CARTEN W. G. (1950): Some sources of variability in cultures of entozoic amoebae. I. The effect of age of cultures, size of inoculum and amount of starch. *J. Parasitol.*, *36*, 238.

GRIFFIN A. M., MICHINI L. J., (1950): Some souces of variability in cultures of entozoic amoebae. II. The effect of age of inoculum. *J. Parasitol.*, *36*, 247.

GRIFFIN A. M., MC CARTEN W. G. (1950): Some sources of variability in cultures of entozoic amoebae. II. Variation in vitality. *J. Parasitol.*, *36*, 253.

HALAWANI A., EL KORDY M. I. (1946): Cultivation of *E. histolytica* in hydatid scolices extract. *J. Roy Egypt. Med. Ass.*, *29*, 211.

HALLMAN F. A., MICHAELSON J. B., DE-LAMATER J. N. (1950): The cultivation of *E. histolytica* in a defined medium. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 363.

HANSEN E. L., ANDERSON H. H. (1948): An essentially synthentic liquid medium for *E. histolytica*. *Parasitology*, *39*, 69.

HANSEN E. L. (1950): A liquid medium composed of dehytrated ingredients for culture of *E. histolytica* associated with a single bacterium. *J. Lab. Clin. Med.*, *35*, 308.

HITCHOCK D. J., RAWSON G. M. (1946): The use of dehytrated, coagulated egg yolk in the preparation of a medium for culturing *E. histolytica*. *J. Parasitol.*, *32*, 170.

HOPKINS D. L., WARNER K. L. (1946): Functional cytology of *E. histolytica*. *J. Parasitol.*, *32*, 175.

INOKI S., NAGAI A., KITAMURA T., TAKEDA S., NAKABAYASHI T. (1950): Studies on the new cultures methods of *E. histolytica*. *Med. J. Osaka Univ.*, *2*, 53.

JACOBS L. (1941): Oxidation-reduction potentials in relation to the cultivation of *E. histolytica*. *J. Parasitol.*, *27*, (Suppl.), 31.

JACOBS L. (1947): Further studies on the maintenance of cultures of *E. histolytica* without viable bacteria. *J. Parasitol.*, *33*, (Suppl.) 20.

JACOBS L. (1947): The elimination of viable bacteria from culture of. *E. histolytica* and the subsequent maintenance of such cultures. *Am. J. Hyg.*, *46*, 172.

JACOBS L. (1950): Oxidation-reduction potentials in the cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 803.

Jacobs L. (1950): The substitution of bacteria in cultures of *E. histolytica*. *J. Parasitol.*, *36*, 128.

Karlsson J. L. (1952): Studies on the physical properties of a growth factor for *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *1*, 548.

Karlsson J. L., Anderson H. H. (1952): Studies on nutritional priciples for *E. histolytica* in autoclaved bacterial cells. *Exptl. Parasitology*, *1*, 347.

Lamy L. (1948): Le probléme de la culture pure des amibes parasites. *C. R. Soc. Biol.*, *143*, 633.

Miller M. J., Firbotte W. R. (1948): Studies on amoebiasis in Canadà. Part. II. A method for obtaining viable cysts of *E. histolytica* free from bacteria. *Can. J. Research*, *E*, *26*, 299.

Nakamura M., Anderson H. H. (1951): Effect of heat - treatment on the respiration of *Trypanosoma cruzi* used for the cultivation of *E. histolylica*. *Am. J. Trop. Med.*, *31*, 438.

Nakamura M. (1952): Substitution of an enzyme preparation for *Trypanosoma cruzi* in cultures of *E. histolytica*. *Kitasato Arch. Exptl. Med.*, *25*, 43.

Nakamura M. (1952): Attemps to exchange associated organism in cultures of *E. histolytica*. *J. Parasitol.*, *38*, 83.

Nakamura M. (1952): The signicance of oxidation-reduction potentials in the cultivation of *E. histolytica*. *Kitasato Arch. Exptl. Med.*, *25*, 47.

Nakamura M. (1953): Nutrition and Physiology of *E. histolytica*. *Bact. Reviews*, *17*, 189.

Nelson E. C. (1947): Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, *27*, 545.

Penfold W. J., Woodkock H. M., Drew A. H. (1916): The excystation of *E. histolytica* (tetragena) as an indication of the vitality of the cysts. *Brit. Med. J.*, *1*, 714.

Pettazzi A. (1950): La cultura delle amebe intestinali. *Boll. Ist. Sier. Mil.*, *29*, 202.

Phillips B. P. (1950): Cultivation of *E. histolytica* with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, *111*, 8.

Phillips B. P., Rees C. W. (1950): The growth of *E. histolytica* with live and heat-treated *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 185.

Porter R. J. (1953): Amebiasis. *Ann. Rev. of. Microb.*, 7, 273.

Rao V. G. (1951): Sterilization of cysts of *E.histolytica* by chemical disinfectants and initiation and maintenance of pure cultures in association with single species of bacteria. *Trans. Roy, Soc. Med. Hyg.*, *44*, 593.

Ress C. W., Reardon L. V., Jacobs L., Jones F. (1941): Problems encountered in the growth of *E. histolytica* in cultures developed by microisolation *Am. J. Trop. Med.*. *21*, 567.

Rees C. W., Reardon L. V., Jacobs L. (1941): The cultivation of the parasitic protozoa without bacteria. *Am. J. Trop. Med.*, *21*, 695.

Rees C. W. (1942): The construction of a micromanipolator for the isolation of protozoa. *Am. J. Trop. Med.*, *22*, 487.

Rees C. W., Bozicevich J., Reardon L. V., Jones F. (1942): A preliminary note on the complement-fixation test for amoebiasis with antigens prepared from *E. histolytica* grown with a single species of bacteria *Am. J. Trop. Med.*, *22*, 581.

Rees C. W., Bozicevich J., Reardon L. V., Daft F. S. (1944): The influence of cholesterol and certain vitamins on the growth of *E. histolytica* with a single species of bacteria. *Am. J. Trop. Med.*, *24*, 189.

Rees C. W., Reardon L. V. (1945): Comparative yields of *E. histolytica - organism t.* from soluble and insoluble ingredients of egg white in freshly prepared and stored medium. *Am. J. Trop. Med.*, *25*, 109.

Rees C. W., Baernstein H. D., Reardon L. V., Phillips L. (1953): Some interactions *in vitro* of *E. histolytica* and single species of microbial symbionts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *2*, 1002.

SADUN E. H., KRUPP I. M., EVERITT M. G. (1952): Cultivation of *E. histolytica* in embryonic fluids. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, *80*, 272.

SAITO M. (1950): Studies on the influences of bacterial flora upon the cultivation of *E. histolytica*. *Kitasato Arch. Exptl. Med.*, *23*, 33.

SAITO M. (1953): Experimental studies on the essential effect of bacterial flora upon the cultivation. of *E. histolytica*. *Kitasato Arch. Exptl. Med.*, *25*, 263.

SAITO M. (1953): Cultivation of *E. histolytica* without actively growing bacteria. I. Cultivation in the preconditioned medium added with antibiotics. *Kitasato Arch. Exptl. Med.*, *25* 245.

SAITO M. (1953): Cultivation of *E. histolytica* without actively growing bacteria. II. Cultivation in the media preconditioned with pure strains of bacteria. *Kitasato Arch. Exptl. Med.*, *25*, 253.

SAPERO J. J., HAKANSSON E. G., LOUTTOT C. M. (1942): The occurrence of two significantly distinct races of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, *22*, 191.

SHAFFER J. G. FRYE W. W. (1948): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. I. Maintenance of a strain of *E. histolytica* through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora. *Am. J. Hyg.* *47*, 214.

SHAFFER J. G., WALTON J. G. FRYE W. W. (1948): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. II. Preliminary observations on the cultivation of *E. histolytica* in a modified thioglycollate medium *Am. J. Hyg.*, *47*, 222.

SHAFFER J. G., RYDEN F. W., FRYE W. W. (1948): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. III. The growth and multiplication of two strains of *E. histolytica* in a trasparent medium without the addition of rice flour and other particulate matter and without demonstrable bacterial growth. *Am. J. Hyg.*, *47*, 345.

SHAFFER J. G., RYDEN F. W., FRYE W. W. (1949): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. IV. Further observations on the cultivation of. *E. histolytica* and other intestinal protozoa in a clear medium without demonstrable bacterial multiplication. Some modifications and simplifications of the medium. *Am. J. Hyg.* *49*, 127.

SHAFFER J. G. (1952): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. V. Studies on the nature of some of the factors in the Shaffer-Frye medium that affect the propagation of *E. histolytica*. *Am. J. Hyg.*, *56*, 119.

SHAFFER J. G., SIENKIEWICZ H. S. (1952): Propagation of a strain of *E. histolytica* in tissue bearing culture. *Science*, *116*, 306.

SHAFFER J. G., SIENKIEWICZ H. S., WASHINGTON J. E. (1953): The propagation of *E. histolytica* in tissue-bearing culture without accompanying bacteria or other microcroorganism. *Am. J. Hyg.*, *57*, 366.

SNYDER T. L., MELENEY H. E. (1943): Anaerobiosis and cholesterol as growth requirements of *E. histolytica*. *J. Parasitol.*, *29*, 278.

SNYDER T. L., MELENEY H. E. (1946): Migration of *E. histolytica* on solid media. *J. Parasitol.*, *32*, 354.

SPINGARN C. L., EDELMAN M. H. (1950): The effect of rice powder on the growth of cultures of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 629.

ST. JOHN J. H. (1952): A new medium for the cultivation of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, *12*, 301.

TANABE M., CHIBA E. (1928): A new culture medium for *E. histolytica*. *Acta Med. Keijo*, *11*, 221.

TARIZZO M. (1948): La cultura dell'*E. histolytica*. *Arch. It. Sc. Med. Col. Paras.*, *29*, 73.

TSUCHIYA H. (1932): A simple medium for *E. histolytica*. *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, *29*, 347.

YOSINDA K. (1918): The encystament of dysentery amebae *in vitro*. *J. Exptl. Med.*, *28*, 387.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

NEMATODOS DE LOS REPTILES DE MEXICO. XI. NUEVO GENERO Y NUEVA ESPECIE DE FILARIA DE IGUANIDOS.

EDUARDO CABALLERO Y CABALLERO (*)

El autor de este trabajo se une cordial y sinceramente al homenaje muy merecido que los parasitólogos italianos y del mundo, rinden a la memoria del ilustre hombre de ciencia Giovanni Battista Grassi, dedicándole la nueva especie.

En dos ocasiones nos ha sido proporcionado material de la filaria que aquí describimos; la primera vez, por el señor profesor Alfredo Barrera, el 24 de mayo de 1948, formado por una hembra y un macho, y la segunda por el señor profesor Rodolfo Pérez Reyes, el 19 de abril de 1954, consistente en dos hembras y cuatro machos. A uno y otro de dichos señores hacemos patente nuestro agradecimiento.

El material de iguánidos de donde procede la filaria, viene siendo capturado periódicamente por las dos personas ya citadas y por los profesores Dionisio Peláez Fernández y Fernando de la Jara, quienes están realizando en estos reptiles un estudio metódico de protozoarios hemáticos.

Saurofilaria grassii n. g., n. sp.

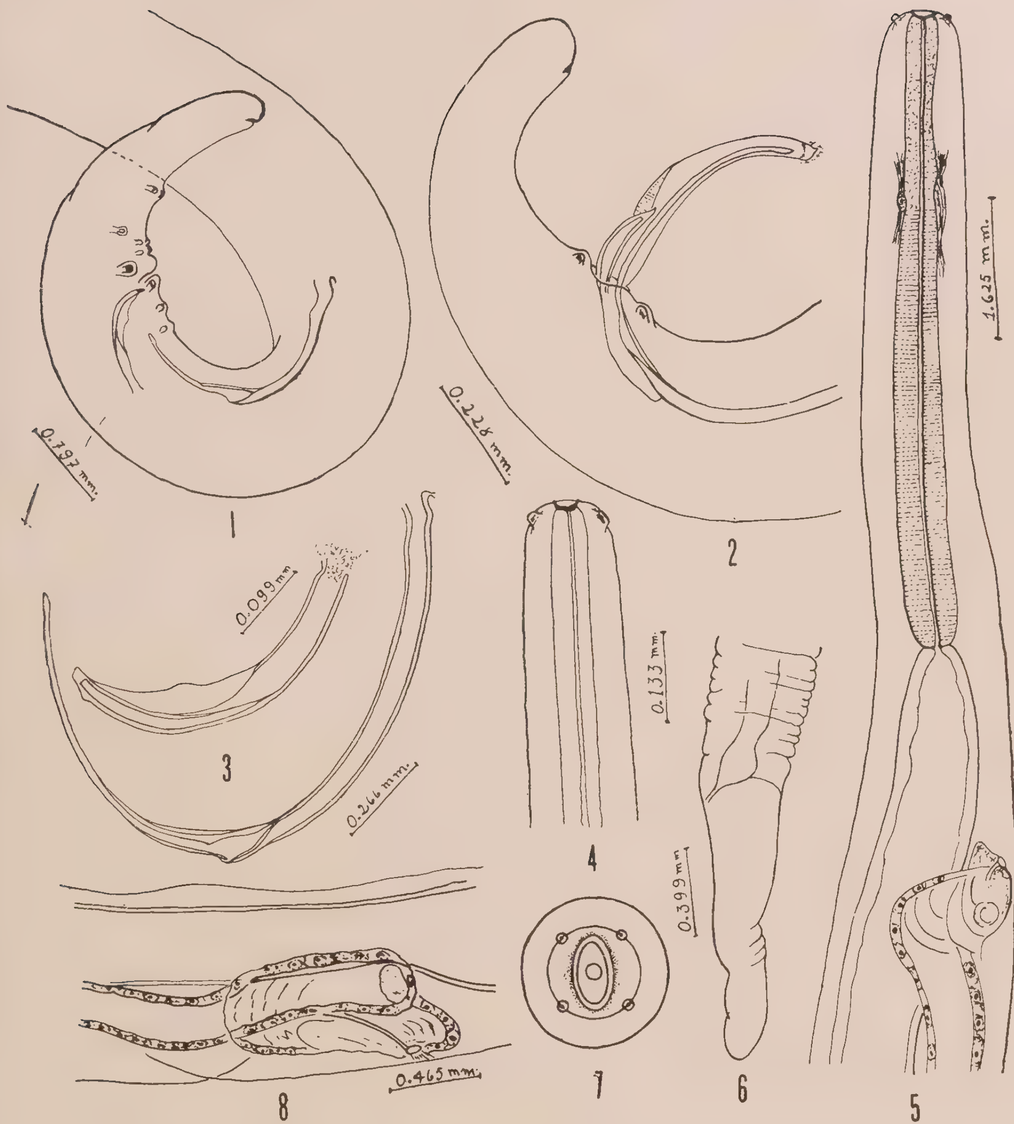
Los ejemplares machos son como de la mitad del tamaño de las hembras, más finos, de color blanquecino transparente y miden de 18.781 a 19.621 mm. de largo por 0.183 a 0.199 mm. de ancho al nivel de su porción más amplia; el extremo anterior es adelgazado, redondeoado y lleva dos pares de papilas submedianas; el extremo posterior se encuentra enrollado en espiral y está desprovisto de alas cuticulares caudales; la cutícula presenta finas estrías longitudinales en toda la superficie del cuerpo y, además de ellas, otras transversales en la región ventral de la cola.

(*) *Laboratorio de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I. P. N. México, D. F.*

La boca es circular y pequeña, ocupa el centro de una área oblonga separada del resto de la porción frontal de la extremidad cefálica por un surco elipsoidal; existen dos pares de papilas submedianas, las cuales están colocadas hacia afuera del surco peribucal; la boca se comunica con un corto atrio quitinizado que mide 0.008 mm. de largo por 0.008 mm. de ancho; el esófago se encuentra claramente dividido en dos porciones, de las cuales la anterior es corta y mide de 0.198 a 0.266 mm. de largo por 0.027 a 0.030 mm. de ancho, y la posterior larga, midiendo de 0.513 a 0.517 mm. de largo por 0.038 a 0.046 mm. de ancho; el intestino es angosto en su iniciación, ensanchándose después, y mide de 0.076 a 0.106 mm. de ancho; el ano es poco perceptible y dista de 0.137 a 0.160 mm. del final de la extremidad caudal. El anillo nervioso está situado al nivel de la terminación del segmento anterior del esófago, y dista de 0.190 a 0.209 mm. del extremo anterior del cuerpo, el poro excretor y las papilas cervicales no fueron observables.

La extremidad caudal se encuentra enrollada en espiral, es digitiforme, carece de alas caudales, es relativamente larga; el sistema de papilas está constituído por ocho pares arreglados de la manera siguiente: 3 pares pequeños preanales, de los cuales uno ocupa una posición lateral con relación al labio anterior de la cloaca; 5 postanales, de los que dos son pequeños y se hallan inmediatamente por detrás de la cloaca, uno a la mitad de la distancia entre la cloaca y el extremo caudal, y dos en posición lateral; de estos últimos, el par que se encuentra a la altura del labio posterior de la cloaca, es el mayor de todos. El extremo de la cola tiene un pequeño conducto ventral que representa el fasmidio. Las espículas son desiguales en tamaño y estructura; están parcialmente quitinizadas y provistas de alas cuticulares membranosas; la menor o derecha es curva, en forma de sable y mide 0.103 mm. de largo por 0.008 mm. de ancho, y la izquierda o mayor también es curva, está formada por dos porciones, la proximal es ancha y quitinizada y la distal es angosta, filiforme y está envuelta por una membrana; esta última espícula mide de 0.266 a 0.296 mm. de largo por 0.008 a 0.011 de ancho; le relación entre las dos espículas es 1:2.8 $\times$ 1:1 a 1:2.5 $\times$ 1:1.3. No existe gubernaculum.

La hembra mide de 37 a 38.844 mm. de largo por 0.315 a 0.365 mm. de ancho; la estructura del extremo cefálico es idéntica a la del macho; el extremo caudal es angosto, liso y digitiforme; la cutícula posee finas estrías longitudinales en todo el cuerpo y transversales al nivel del extremo caudal. El atrio bucal mide de 0.008 a 0.011 mm. de largo por 0.008 a 0.011 mm. de ancho; el esófago anterior mide 0.247 mm. de largo por 0.046 a 0.049 mm. de ancho y el posterior de 0.532 a 0.707 mm. de largo por 0.053 a 0.076 mm. de ancho; el intestino mide de 0.152 a 0.163 mm. de ancho y el ano dista de 0.247 a 0.251 mm. del extremo caudal. El anillo nervioso está situado al nivel de la terminación del esófago anterior y dista de 0.239 a 0.266 mm. del extremo anterior del cuerpo; el poro excretor y las papilas cervicales no fueron observables.



Lamina I. *Saurofilaria grassii* n. gen., n. sp.; (1) Extremidal caudal de un ejemplar macho mostrando el arreglo papilar y las espículas. Vista lateral; (2) Extremidad caudal de otro macho mostrando la estructura de las espículas. Vista lateral; (3) Espículas mostrando su forma y estructura; (4) Extremidad cefálica de un macho. Vista lateral; (5) Extremidad cefálica de una hembra mostrando la porción anterior del aparato digestivo y la región vulvar. Vista lateral; (6) Extremidad caudal de una hembra mostrando el ano. Vista lateral; (7) Vista frontal de la extremidad cefálica mostrando la placa peribucal y las papilas (8) Región vulvar mostrando el principio del ovopositor. Vista lateral.

El aparato reproductor es opistodelfo, está formado por un solo ovario y un útero; el ovopositor es largo, cilíndrico, está dirigido de atrás hacia adelante, doblándose al nivel de la vulva, presentando un engrosamiento y mide de 2.158 a 3.187 mm. de largo por 0.065 a 0.076 mm. de ancho; la vulva es claramente perceptible, se encuentra situada muy por detrás del esófago posterior, es decir, al nivel de la parte anterior del intestino y dista de 1.245 a 1.328 mm. del extremo anterior; son filarias vivíparas.

Las microfilarias se encuentra en la sangre periférica; son formas larvarias grandes, provistas de una vaina, y miden de 0.327 a 0.329 mm. de largo por 0.007 mm. de ancho; el extremo cefálico es ancho y romo, y el caudal se adelgaza, pero sin terminar en punta. La cadena nuclar es compacta, los núcleos cefálicos y los caudales son angostos y largos; algunos de los cefálicos miden de 0.005 a 0.007 mm. de largo; el espacio cefálico es amplio y mide de 0.012 a 0.016 mm. de largo por 0.005 mm. de ancho; el anillo nervioso se halla

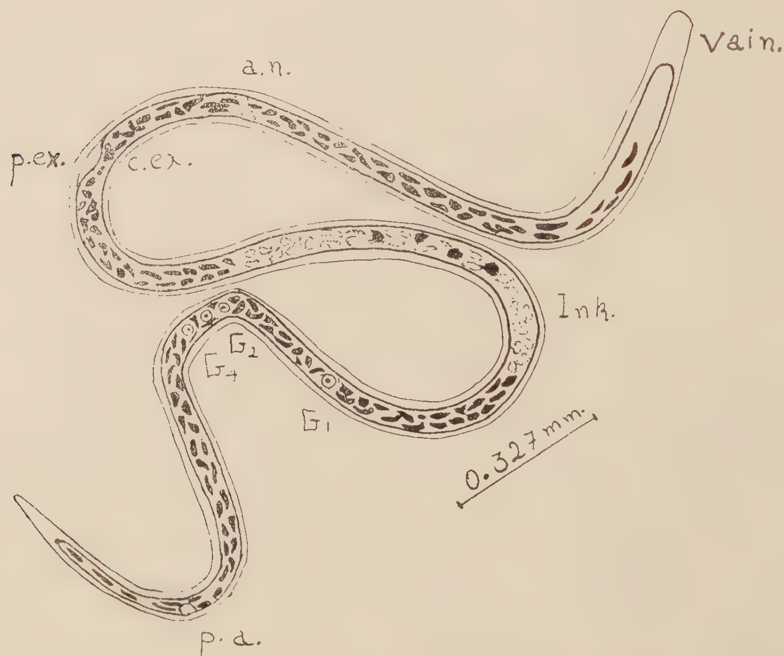


Lámina II. Microfilaria de *Saurofilaria grassii* n. gen., n. sp. Vain., vaina; an., anillo nervioso; p. ex., poro excretor; c. ex., célula excretora; Inn. K., cuerpo intermedio; G1, G2, G3 y G4, núcleos de las células rectales; p. a., poro anal.

muy retirado de la extremidad cefálica, de 0.080 a 0.086 mm. del extremo anterior; el poro excretor dista de 0.111 a 0.112 mm. del mismo extremo; el núcleo de la célula excretora es grande y triangular; el cuerpo intermedio (Innen Körper) es amplio, se tiñe intensamente en rosa con Giemsa y su porción anterior dista de 0.163 a 0.164 mm. del extremo anterior; la primera

célula G1 (célula rectal) es grande, está aislada y dista de 0.215 a 0.235 mm. del extremo cefálico; las células rectales G2, G3 y G4 son contiguas y se hallan separadas de la célula G1 por un amplio espacio nuclear; el poro anal y el núcleo de la célula anal son poco definidos, distando el primero de 0.298 a 0.307 del extremo cefálico. La localización de las estructuras anteriormente citadas, en términos de tanto por ciento, es la siguiente: primer núcleo cefálico, de 3.6 a 4.89%; anillo nervioso, de 24.40 a 26.1%; poro excretor, de 33.7 a 34.2%; núcleos anteriores del Innen Körper, de 49.5 a 50.1%; primera célula rectal (G1), de 65.3 a 71.8% y poro anal, de 91.1 a 93.3% del extremo cefálico.

Hospedador. — *Sceloporus ferrariperezi ferrariperezi* Cope, 1885.
Localización. — Adultos, en las hojas peritoneales, y microfilarias, en la sangre.
Distribución geográfica. — Barranca del Muerto, Lomas de Chapultetec, México, D. F.
Tipo. — Colección Helmintológica del Instituto de Biología. N°. 143-1.
Paratipo. — Coleción Helmintológica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N°. 332-1.

Saurofilaria n. gen.

Dipetalonematinae: Filaria de cuerpo pequeño; macho como de la mitad del tamaño de la hembra; cutícula transparente y con estrías finas longitudinales en todo el cuerpo y transversales al nivel de la extremidad caudal; sin alas laterales anteriores en el cuerpo; extremidad cefálica redondeada, llevando una pequeña placa oblonga peribucal con cuatro papilas submedianas; boca circular que comunica con un corto atrio quitinoso; esófago dividido en dos porciones, la posterior terminando ligeramente en clava; intestino ancho; ano poco aparente, subterminal. Extremidad caudal de la hembra, digitiforme y relativamente larga; macho con extremidad caudal enrollada en espiral, sin alas cuticulares laterales y un poco larga, con ocho pares de papilas, tres preanales y cinco postanales, dos francamente laterales y uno a la mitad de la distancia entre la cloaca y el final de la cola, el cual no lleva papilas, sino el fasmidio. Espícula desiguales por su forma, tamaño y estructura, provistas de expansiones cuticulares laterales a manera de alas membranosas y constituídas de dos partes, una quitinizada y otra membranosa; curvas; la relación de tamaño entre las dos espículas es 1:2.8 × 1:1 a 1:2.5 × 1:1.3; aparato reproductor de la hembra opistodelfo, un solo ovario y un útero, ovopositor cilíndrico dirigido de atrás hacia adelante; vulva fuertemente desarrollada y situada al nivel de la porción anterior del intestino; vivíparas. Microfilarias en la sangre, envainadas, grandes, con cadena nuclear

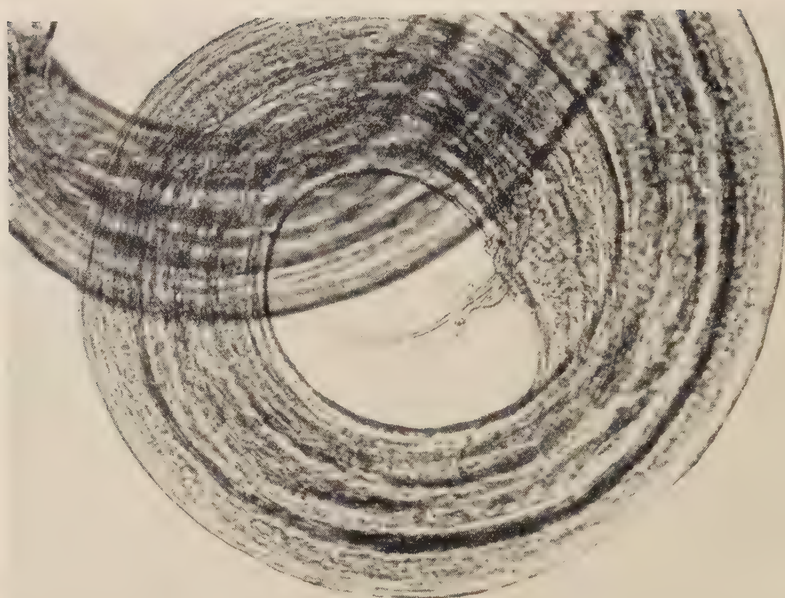


Lámina III. Microfotografía de la extremidad caudal de *Saurofilaria grassi* n. gen. n. sp. mostrando las espiculas aladas. Vista lateral.

compacta; espacio cefálico amplio y desprovisto de núcleos; núcleos cefálicos alargados y grandes; anillo nervioso muy distante de los primeros núcleos cefálicos; región caudal angosta y con una sola hilera de núcleos alargados.

Genotipo. — *Saurofilaria grassii* n. sp.

Localización. — Adultos, en las hojas peritoneales y microfilarias en la sangre de *Iguanidae*, Reptilia

Discusión.

Saurofilaria n. gen. es samejante a *Macdonaldius* Khanna, 1933, otro género de filaria de saurios, por los siguientes caracteres estructurales. 1°. presencia de un atrio bucal quitinoso; 2°. extremidad caudal del macho enrollada en espiral; 3°. espículas desiguales en tamaño; 4°. vulva situada al nivel de la parte anterior del intestino; 5°. ovopositor largo, cilíndrico y dirigido de atrás hacia adelante y 6°., microfilarias envainadas; pero se diferencia por las estructuras siguientes: 1°. aparato peribucal; 2°. esófago dividido claramente en dos porciones; 3°. arreglo del aparato papilar caudal; 4°. espículas provistas de alas membranosas; 5°. ausencia de gubernaculam y 6°., estructura de la microfilaria cuyos núcleos cefálicos y caudales son alargados y cuyo anillo nervioso está muy distante de la extremidad cefálica. Consideramos que todos

estos caracteres diferenciales son más bien genéricos que específicos, y suficientes para justificar la creación del nuevo género que aquí se propone.

En 1935 Vaz y Pereira describieron la segunda especie de *Macdonaldius*, *M. carinii*, *filaria* que encontraron en el corazón de *Elapomorphus tricolor*, de Sao Paulo, Brasil. Examinando la descripción y los dibujos de estos autores, hemos encontrado que la especie descrita por ellos no corresponde al género *Macdonaldius* Khanna, 1933, pues la estructura de la extremidad cefálica, la forma y estructura de las espículas, la ausencia del gubernaculum y las microfilarias no envainadas, son caracteres que no se encuentran en *Macdonaldius*, género que, el eliminar de él a la especie de Vaz y Pereira, vuelve a ser monotípico.

Creemos que *Macdonaldius carinii* Vaz y Pereira 1935, por sus caracteres morfológicos, debe ser clasificado en el género *Piratuba* Lent y Freitas 1941, quedando por tanto como *Piratuba carinii* (Vaz y Pereira 1935) n. comb., diferenciándose de la especie tipo por el número de papilas caudales del macho y por la desigualdad en el tamaño de las espículas, caracteres todos estos que enmiendan la diagnosis del género *Piratuba*, dada por Lent y Freitas.

SUMARIO

Se describe un nuevo género de filaria de lagartijas (*Iguanidae*) cuyos caracteres diferenciales son: *a*), boca provista con una placa oblonga rodeata por cuatro papilas submedianas; *b*), atrio bucal ligeramente quitinizado; *c*), esófago dividido claramente en dos porciones; *d*), extremidad caudal del macho arrollada en espiral y provista con ocho pares de papilas sésiles ventrales y laterales, pre y postanales; *e*), no existen alas caudales; *f*), espículas desiguales en tamaño y estructura, semiquitinizadas, con alas membranosas, espícula mayor con el extremo proximal ancho y el distal filiforme y alado; *g*), ausencia de gubernaculum; *h*), hembras con extremidad caudal digitiforme; *i*), vulva en la porción anterior del intestino; *j*), ovopositor largo y dirigido de atrás hacia adelante; *k*), ovario y útero únicos (opistodelfo); *l*), microfilarias envainadas y sanguinícolas, con núcleos cefálicos y caudales alargados, y anillo nervioso muy distante de la extremidad cefálica. Especie tipo: *Saurofilaria grassii* n. sp.

Por los caracteres anteriormente citados, se diferencia *Saurofilaria* de *Macdonaldius* Khanna, 1933, al cual en cambio se asemeja por la posición de la vulva, por la dirección del ovopositor y, en general, por el arreglo del aparato reproductor femenino.

Macdonaldius carinii Vaz y Pereira, 1935 es transferido en este trabajo al género *Piratuba* Lent y Freitas, 1941, como *Piratuba carinii* (Vaz y Pereira, 1935) n. comb., atendiendo a que esta especie no posee caracteres del género *Macdonaldius* Khanna, 1933; la desigualdad en el tamaño de las espículas constituye un carácter diferencial con la especie *Piratuba digiticauda* Lent y Freitas, 1941, carácter que induce a enmendar la diagnosis genérica de los helmintólogos del Instituto Oswaldo Cruz.

RIASSUNTO

Viene descritto un nuovo genere di filarie delle lucertole (*Iguanidae*), come *Saurofilaria* n. g.; esso ha i seguenti caratteri distintivi: *a*) bocca provvista di una placca oblunga circondata da quattro papille cefaliche submediane; *b*) vestibolo boccale leggermente chitinizzato; *c*) esofago diviso distintamente in una porzione anteriore corta ed in una posteriore lunga; *d*) estremità caudale dei maschi arrotolata in strette spirali e provvista ventralmente e lateralmente di otto paia di papille sessili (pre e postanali); *e*) ali caudali assenti; *f*) spicoli ineguali per dimensioni e struttura, leggermente chitinizzati, con ali membranose: lo spicolo più lungo con estremità prossimale larga e porzione distale filiforme alata; *g*) gubernaculum assente; *h*) estremità caudale delle femmine digitiforme; *i*) vulva e livello della porzione anteriore dell'intestino; *j*) ovopositore lungo e diretto anteriormente; *k*) utero unico (monodelfo e opistodelfo); *l*) microfilarie con guaina, con nuclei caudali e cefalici allungati, con *anello nervoso* molto distante dalla estremità cefalica. Sanguicolo. Genotipo: *Saurofilaria grassii* n. sp.

Il nuovo genere differisce dal *Macdonaldius* Khanna, 1933, per i caratteri suddetti, benchè sia simile a questo genere per la posizione della vulva, la direzione dell'ovopositore e per la disposizione generale dell'apparato riproduttore femminile.

Macdonaldius carinii Vaz e Pereira, 1935, viene trasferito per i suoi caratteri morfologici nel genere *Piratuba* Lent e Freitas, 1941, come *Piratuba carinii* (Vaz e Pereira, 1935) comb. nov: essa si differenzia dalla specie tipo *Piratuba digiticauda* Lent e Freitas 1941 per la diversa grandezza degli spicoli e per il numero delle papille caudali del maschio, caratteri tutti che emendano la diagnosi del gen. *Piratuba*.

SUMMARY

A new genus of filarial nematodes from lizards (*Iguanidae*) designated as *Saurofilaria* gen, nov., is described as having the following distinguishing characters: a). mouth provided with an oblong plate surrounded by four submedian head papillae; b), buccal vestibule slightly chitinized; c), oesophagus distinctly divided into a short anterior and a long posterior portion; d), caudal extremity of males rolled into tight spirals and provided ventrally and laterally with eight pairs of sessile papillae (pre- and post-anal); e), caudal alae absent; f), spicules unequal in size and structure, slightly chitinized, with membranous alae, the longer spicule with wide proximal extremity and winged, filiform distal portion; g), gubernaculum absent; h), caudal extremity of females digitiform; i), vulva at level of anterior portion of intestine; j), ovopositor long and anteriorly directed; k), uterus single (monodelphys and opisthodelphys); l), microfilariae sheathed, with elongate caudal and cephalic nuclei, the nerve ring being located very distant from the cephalic extremity. Found in the blood. Genotype: *Saurofilaria grassii* sp. nov.

The new genus differs from *Macdonaldius* Khanna, 1933 in the above cited characters, though it is similar to this genus with respect to the position of the vulva, the direction of the ovopositor, and in the general arrangement of the female reproductive apparatus.

Macdonaldius carinii Vaz and Pereira, 1935 is transferred to the genus *Piratuba* Lent and Freitas, 1941, as *Piratuba carinii* (Vaz and Pereira, 1935) comb. nov. since it lacks the characters of the genus *Macdonaldius* and the difference in size of the spicules in this species constitutes a character differentiating it from the species *Piratuba digiticauda* Lent and Freitas, 1941, a character which leads to emend the generic diagnosis of Instituto Oswaldo Cruz helminthologists for *Piratuba*.

BIBLIOGRAFIA

BAYLIS H. B. (1939): The Fauna of British India, including Ceylon and Burma. Nematoda. Vol. II (*Filarioidea, Dioctophymoidea* and *Trichinelloidea*). I-XXIII + 1-274. Taylor and Francis. London.

BAYLIS H. B. Y DAUBNEY R. (1926): A synopsis of the Families and Genera of Nematoda. I-XXXVI + 1-277. British Museum. London.

CHABAUD A. G., Y CHOQUET M. T. (1953): Nouvel essai de classification des filaires (superfamille des *Filarioidea*). *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, *XXVIII*, 172-192.

FREITAS, J. F. T. DE Y LENT, H. (1937): Sobre *Oswaldofilaria brevicaudata* (Rodhain y Vuylsteke, 1937) n. comb. (Nematoda, *Filarioidea*). *Mem. Inst. Osw Cruz*, *XXXI* 439-442.

JOHNSTON, T. H. Y MAWSON, P. M. (1943): Remarks on some Nematodes from Australian Reptiles. *Trans. Roy. Soc. South Australia*, *LXVII*, 183-186.

KHANNA, R. K. (1933): A New Filarial Worm from a North American Snake. *Journ. Hel.*, *XI*, 105-108.

LENT, H. Y FREITAS, J. F. T. DE (1941): Sobre os Filarideos parasitos de Lacertideos Neotrópicos. *Rev. Brasil. Biol.*, *I*, 383-386.

SEURAT, L. G. (1917): Filaires des Reptiles et des Batraciens. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afriq. Nord.*, *VIII*, 236-242.

SKRJABIN, K. I. Y SCHIKHOBALOVA, N. P. (1936): Contribution au remaniement de la Classification des nématodes de l'ordre des *Filariata* Skrjabin 1915. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, *XIV*, 61-75.

SKRJABIN, K. I. Y SCHIKHOBALOVA, N. P. (1938): Filarii zhivotnyj i chelovieka. 1-608. Oguiz-Sieljozguiz. Moskva. (En ruso).

STOSSICH, M. (1897): Filarie e Spiroptere. Note parassitologiche. Lavoro monografico. *Boll. Soc. Adr. Sci. Nat. Trieste.* *XVIII*, 1-162.

TRAVASSOS, L. (1933): Sobre os filarideos dos crocodillos sul-americanos. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* *XXVII*, 159-164.

VAZ, Z. Y PEREIRA, C. (1935): Some new Brazilian nematodes. *Trans. Am. Micr. Soc.* *LIV*, 36-40.

WEHR, E. E. (1935): A revised classification of the nematode superfamily *Filarioidea*. *Proc. Hel. Soc. Wash.* *II*, 84-88.

YORKE, W. Y MAPLESTONE, P. A. (1926): The Nematode Parasites of Vertebrates. 1-XI 1-536. Blakiston's Son and Co. Philadelphia.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SULLA BIOLOGIA E MORFOLOGIA DELLA CERCARIA DELLO *SCHISTOSOMA BOVIS* CAUSA DI DERMATITE PAPULARE DELL' UOMO

ARTURO CARTA (*) e SAVATORE DEIANA (*)

CORT (1928) per primo accertò che nel Michigan (U.S.A.) le cercarie di alcuni schistosomi aviari sono la causa di una particolare dermatite dell'uomo.

La malattia insorge in diverse parti del corpo dopo immersione nell'acqua di certi laghi, stagni, paludi, ecc. ed è caratterizzata dall'eruzione di papule molto pruriginose che, se non si stabiliscono complicanze, giungono a guarigione spontanea in due-tre settimane.

In seguito, questa dermatite, volgarmente denominata « *Swimmer's itch* » (*rogna o scabbia o prurito dei nuotatori*), fu segnalata in altre regioni degli Stati Uniti e precisamente nello Iowa (CORT, 1928), nel Minnesota (CHRISTENSON, R. O. e W. P. GREENE, 1938), nel Visconsin (EDWARDS A. C. e S. BRACKETT 1938), ecc.. Inoltre, la malattia fu registrata nel Canadà (W. E. SVALES, 1936) e nel continente europeo: Francia (E. BRUMPT, 1931), Germania (H. VOGEL, 1930), Inghilterra (C. MATHESON, 1930), Svizzera (G. R. LA RUE, 1935). Altre osservazioni furono fatte nella Malesia (J. J. C. BUCKLEY, 1938), nel Sud Africa (POTER, 1938) e nell'Australia (MACFARLANE, 1949), e, data la larga diffusione dell'agente eziologico, non a torto, W.W. CORT, D. B. MAC MULLEN, L. OLIVIER e S. BRACKETT (1940) dissero che ulteriori segnalazioni del morbo potevano attendersi da qualunque altra parte del mondo.

La malattia, sebbene non assuma caratteri di particolare gravità, rappresenta un vero problema per i luoghi balneari di villeggiatura e perciò, forse, fu ed è oggetto di numerosi studi inerenti specialmente l'eziologia.

Fu accertato che l'affezione è determinata da diverse specie di cercarie, le quali diversificano generalmente da luogo a luogo e che la maggior parte di esse sono forme larvali di tricobilharzie, parassiti che, come è noto, allo stato

(*) *Istituto di patologia generale e anatomia patologica dell'Università di Sassari e U.N.R. Centro di studio per la Parassitologia veterinaria* (Direttore: Prof. A. CARTA).

perfetto albergano nel sistema venoso, per lo più, di volatili acquatici (anatre, ecc.); mentre ospiti intermedi sono molluschi di acqua dolce dei generi *Limnaea*, *Physa*, ecc..

Nel Nord America (Stati Uniti e Canadà) la malattia sarebbe determinata da almeno 4 tipi di cercarie: la *cercaria douthitti* (Cort, 1914), la *cercaria elvae* (Müller, 1923), la *cercaria physellae* (Talbott, 1936) e la *cercaria stagnicolae* (Talbott, 1936).

In Europa questa dermatite, che Brumpt (1931) denominò «*dermatite des nageurs*» (dermatite dei nuotatori), secondo le ricerche di Matheson (1930), di Taylor e Bayliss (1930), di Vogel (1930) e di Brumpt (1931), sarebbe determinata dalla cercaria della *Tricobilharzia ocellata*, La Vallette, Saint Georges, 1854, il cui ospite definitivo è l'anatra.

Ma, secondo Szidat (1942) in Germania la malattia sarebbe dovuta a tre diversi tipi di cercarie morfologicamente simili alla *cercaria ocellata*, dalla quale però si differenzierebbero perchè nell'anatra non evolvono in parassiti perfetti. Vale a dire ancora non si conoscerebbero gli ospiti definitivi e tanto meno i parassiti adulti delle suddette cercarie che, pertanto, lo stesso Szidat denominò rispettivamente, *cercaria paraocellata*, *cercaria pseudoocellata* e *cercaria neoocellata*.

Anche in Australia la malattia sarebbe sostenuta da cercarie del tipo *ocellata*, così come nella Nuova Zelanda (Macfarlane, 1944).

In Malesia il morbo, che colpisce specialmente le persone addette ai lavori delle risaie, è denominata «*Sawah itch*» ed è sostenuto, invece, dalla cercaria dello *Schistosoma spindalis* (Montgomery, 1905), i cui ospiti definitivi, come si sa, sono bovini, ovini, caprini, ecc..

In una recente revisione critica sulle dermatiti determinate da cercarie di schistosomi, Cort (1950) mise in rilievo che 18 delle 31 specie note di cercarie di schistosomi sono causa di dermatite papulare nell'uomo.

Da quanto sopra detto si deduce, dunque, che, sia la «*Swimmer's itch*» del Nord America, che la «*Dermatite des nageurs*» del Continente Europeo, dell'Australia e del Sud Africa, come la «*Sawah itch*» della Malesia, sono affezioni cutanee dell'uomo sostenute da forme larvali (cercarie) di parassiti (schistosomi) che, allo stato perfetto, non sono ospiti abituali nè occasionali dell'uomo.

Vi è fondato motivo, pertanto, di tenere distinta la suddetta dermatite da quella che nell'uomo determinano le cercarie degli schistosomi che gli sono propri, come, per es., le cercarie dello *Schistosoma haematobium*, dello *Schistosoma mansoni*, dello *Schistosoma japonicum*, ecc., anche perchè, esse, come si sa, determinano un'affezione di breve durata (da poche ore a qualche giorno), la quale è sostenuta specialmente del secreto delle c. d. ghiandole di penetrazione delle cercarie.

La dermatite prima detta, invece, ha un decorso più lungo (2-3 settimane

negli individui sensibilizzati da una prima infestazione) ed è determinata, con molta verosimiglianza, oltrechè dal secreto delle ghiandole di penetrazione delle cercarie, dal prodotto di disfacimento del corpo degli stessi parassiti che, non trovando l'ambiente adatto per evolvere in forma adulta, s'arrestano nella cute ove subiscono fenomeni involutivi e distruttivi.

Nessuna segnalazione della malattia fu fatta in Italia. Tuttavia, secondo nostre osservazioni, già rese note (Carta, 1954), essa è abbastanza frequente in certi luoghi della Sardegna (Gallura, Baronia, ecc.), ove è determinata però da una cercaria, la quale non figura fra le cercarie che causano la malattia in altri Paesi ed alla quale qualche A. (Brumpt, 1931) negò addirittura detta azione patogena: s'intende alludere alla cercaria dello *Schistosoma bovis*, Sonsino, 1876.

In Sardegna la malattia si reperta nel periodo estivo ed esclusivamente nelle zone ove si verifica la *bilharziosi* o *schistosomiasi* dei ruminanti (Baronia, Gallura, ecc.). Normalmente si ammalano le persone che immergono parti del corpo, per lo più braccia e gambe, nell'acqua di certe paludi o di certi acquitrini, dove albergano gasteropodi del genere *Bulinus* (*Bulinus contortus*), i quali, come è noto, sono gli ospiti intermedi dello *Schistosoma bovis*.

Con le cercarie fuoriuscite dai suddetti molluschi si ottenne nei conigli, negli ovini, ecc., il parassita perfetto (*Schistosoma bovis*) e nell'uomo l'anzidetta dermatite (Carta).

L'affezione che si reperta in Sardegna, trova riscontro, pertanto, più che con la « *Swimmer's itch* » del Nord America o con la « *dermatite des nageurs* » della Francia, della Germania, dell'Inghilterra, ecc., còn la « *Sawah itch* » della Malesia, dato che anche questa dermatite è determinata, appunto, dalla cercaria di uno schistosoma dei ruminanti (*Sch. spindalis*); mentre, come si è prima fatto presente, gli agenti eziologici della « *Swimmer's itch* » e della « *dermatite des nageurs* » sono le cercarie di bilharzielle di volatili acquatici (anatre, ecc.).

Orbene, per il fatto sperimentalmente accertato e secondo il quale, ripetiamo, la cercaria dello *Schistosoma bovis* è agente di malattia, oltrechè per i nostri animali (bovini, ovini, caprini), anche per l'uomo, lo studio della biologia e della morfologia di questo parassita rappresenta un argomento di attualità e non privo d'interesse scientifico e pratico sia per la patologia veterinaria che per la patologia umana ed in ciò sta appunto il fine di questa nota.

* * *

Le indagini che verranno quì esposte furono condotte su cercarie emesse da *Bulinus contortus*, naturalmente infesti, raccolti, nell'estate degli anni 1953 e 1954, da paludi ed acquitrini, distante qualche km. dal mare, siti nei comprensori di Santa Teresa Gallura (Prov. Sassari e di San Teodoro (Prov. Nuoro).

In detti luoghi già alla fine del mese di maggio si trovano esemplari di *Bulinus* infesti da cercarie di *Schistosoma bovis*, ma in percentuale piuttosto bassa (1-2%). La percentuale dei *Bulinus* infesti aumenta progressivamente nei mesi successivi fino a raggiungere, verso la fine del mese di agosto, la punta più elevata, che si calcola di circa il 30-35%. Poi, detta percentuale decresce e, verso la fine del mese di settembre, oltre ad una considerevole diminuizione numerica dei *Bulinus* — dovuta, forse, a morte delle vecchie generazioni dopo deposizione delle uova — si ha che soltanto l'1-2% dei molluschi sono infesti e generalmente da un numero assai limitato di parassiti (DEIANA, 1953).

Nelle giornate non nuvolose e molto calde — specialmente quando l'acqua della palude o dell'acquitrino supera la temperatura di 24°C. — avviene che le cercarie si raccolgono, più numerose, nel pelo dell'acqua.

Queste proprietà di fototaxi positiva e di geotaxi negativa — le quali, come è noto, furono accertate dapprima per la *cercaria ocellata* (TAYLOR e BAYLISS 1930) e successivamente per la *cercaria longicauda* (MACFARLANE, 1949) e per la cercaria della *Bilharziella polonica* (NEUHAUS, 1953), per la cercaria dello *Sch. bovis* le accertammo anche in laboratorio osservando il comportamento degli esemplari emessi dai *Bulinus* che, con tale fine, furono messi in cilindri di vetro trasparente contenenti acqua di fonte a 28-30°C. e sotto l'azione di una sorgente luminosa (lampada da 150 Watt distante 50 cm. dal cilindro).

Esaminando anche con semplice lente di ingrandimento le cercarie fuori uscite dai *Bulinus* sottoposti al suddetto trattamento fu possibile sincerarsi, inoltre, che i movimenti, di cui esse risultano dotate, sono la conseguenza di rapidissime oscillazioni dell'appendice caudale e che una loro peculiare caratteristica è quella di tenere il corpo in posizione verticale o leggermente obliqua. Infatti, tutti gli esemplari, allorchè cessano di nuotare, si fissano alla parete del cilindro mediante la ventosa ventrale.

Dall'osservazione condotta su questi esemplari si ricava ancora che periodi di oscillazioni della coda si alternano con altrettanti ed eguali periodi di riposo.

La vitalità delle cercarie fuoriuscite dai *Bulinus*, a giudicare dalle osservazioni da noi fatte in laboratorio, non si direbbe molto lunga, essendo risultata di circa 36 ore.

Lo studio morfologico fu condotto esclusivamente sopra cercarie fuoriuscite dai *Bulinus contortus* in seguito al trattamento prima detto.

Le cercarie furono colorate vitalmente immergendole per qualche minuto in soluzione acquosa all'1:10.000 di rosso neutro o di bleu Nilo o di verde di metile, onde mettere in evidenza, rispettivamente, le c. d. ghiandole di penetrazione, le c. d. cellula a fiamma, il sistema escretore, le cellule cuticolari, ecc..

Per ridurre i vivaci e rapidi movimenti di cui detti parassiti sono dotati, successivamente, furono immersi in qualche goccia di plasma bovino che, prima liofilizzato, si riprese al momento dell'uso con una quantità d'acqua distillata da renderne la viscosità almeno tripla in confronto alla norma. L'uso di

questa sostanza, rispetto a quelle che normalmente si impiegano per lo stesso scopo (siero normale, albume d'uovo, soluzione di cocaina, ecc.), offre il van-

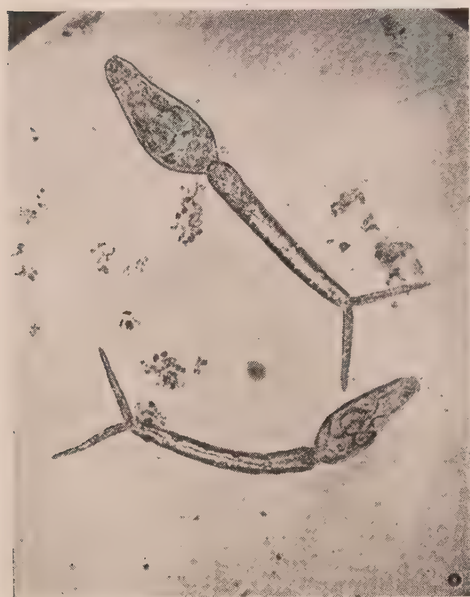


Fig. 1. - Furcocercarie di *Schistosoma bovis*. Sonsino 1876.

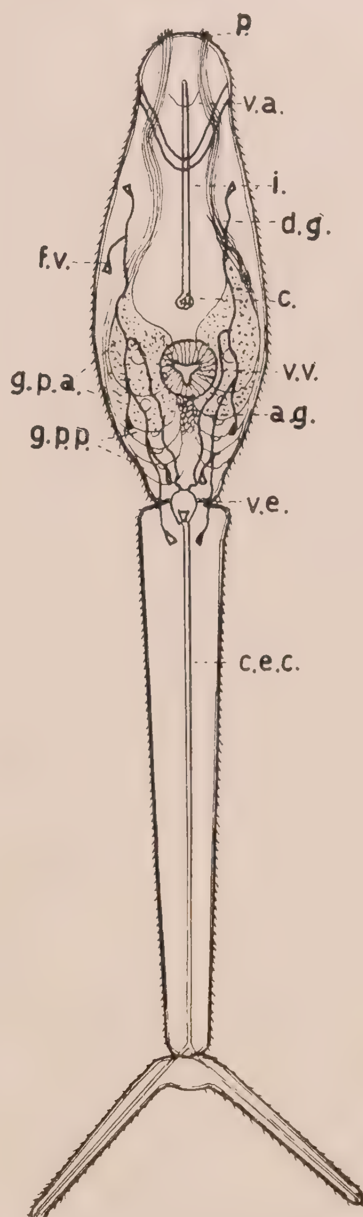


Fig. 2. - Figura schematica della cercaria di *Schistosoma bovis*. p. papille; v. a. ventosa anteriore; i. intestino; d. g. dotti ghiandolari; c. cieco; f. v. fiamme vibratili; v v. ventosa ventrale; a. g. abbozzo genitale; g. p. a. ghiandole di penetrazione anteriori; g. p. p. ghiandole di penetrazione posteriori; v. e. vescicola escretrice; c. e. c. condotto escretore caudale.

taggio che i parassiti rimangono in vita un tempo maggiore conservando inalterate le caratteristiche morfologiche.

Quindi il parassita messo tra due vetrini (porta e copri-oggetto) fu sottoposto all'esame microscopico a luce diretta e a luce riflessa, come anche

applicando il contrasto di fase che, per questo genere di studio, riteniamo assolutamente indispensabile, almeno per la differenziazione di certe strutture che a luce normale non sempre è possibile apprezzare.

Le misurazioni delle cercarie furono fatte esclusivamente su esemplari che, mediante i sopraddetti accorgimenti tecnici, risultarono viventi, distesi e pressochè immobili.

Come è noto, la cercaria dello *Schistosoma bovis* è caratterizzata da corpo allungato, di forma pressochè cilindrica, provvisto di due ventose — una anteriore (apicale) e l'altra mediana (ventrale) — e da coda lunga, sottile e bi furcuta (*furcocercaria*) (Fig. 1).

Il corpo e la coda del parassita sono rivestiti da uno straterello cuticolare che non assume i colori vitali anzidetti e che osservandolo specialmente a contrasto di fase, appare armato da numerosissime e minutissime formazioni spinose con orientamento anteposteriore rispetto alla lunghezza del parassita (Fig. 2).

Il corpo misura 220-265 micron di lunghezza per 55-85 micron di larghezza a livello della ventosa ventrale. La ventosa apicale non presenta limiti molto netti; nel suo centro sbocca l'intestino primitivo, il quale termina, con due fondi ciechi un poco lobati, anteriormente alla ventosa ventrale. Non esiste faringe, nè macchie oculari.

Nella metà posteriore del corpo della cercaria sono disposte le c. d. *cellule* o *ghiandole di penetrazione* in numero di 5 per lato: 2 anteriori, acidofile site all'altezza della ventosa ventrale e 3 basofile che occupano, quasi completamente, la restante porzione posteriore del corpo della larva.

Con le colorazioni vitali le c. d. cellule di penetrazione appaiono caratterizzate da grosso nucleo vescicoloso e da abbondante alone citoplasmatico, il quale, nelle cellule anteriori, risulta ricco di grossi granuli acidofili, mentre in quelle posteriori assume, in maniera quasi uniforme, una colorazione basofila.

Ciascuna ghiandola di penetrazione si continua con un canale che, dopo un decorso a doppia S, termina con una formazione papillare nel margine anteriore superiore della ventosa apicale.

Il sistema escretore è rappresentato da due canali a decorso tortuoso situati lateralmente nel corpo del parassita; in essi si immettono i canalicoli provenienti delle c. d. cellule a fiamma o fiamme vibratili.

Le c. d. cellule a fiamma sono in numero di 5 per lato e, pertanto, la loro formula più probabile sarebbe: $((2+2)+1)\ 2 = 10$.

Nella vescicola escretrice, di forma rotondeggiante, del diametro di circa 12 micron, sita nella porzione posteriore del corpo e cioè in prossimità dell'attacco della coda, si immettono due tubuli che provengono dai canali escretori laterali.

La coda, come si è già detto, è biforcuta, lunga e sottile; misura da 240

a 280 micron di lunghezza e da 45-50 micron di larghezza in corrispondenza dell'attacco col corpo.

Le branche della forchetta sono lunghe 80-100 micron.

RIASSUNTO

In considerazione dell'interesse scientifico e pratico che presenta la cercaria dello *Schistosoma bovis*, Sonsino 1876, per la patologia comparata, poichè essa determina, oltrechè schistosomiasi mesenteriale dei ruminanti, dermatite papulare nell'uomo, gli AA. illustrano la biologia e la morfologia del parassita da loro repertato in Sardegna (Gallura, Baronia) nel *Bulinus contortus*.

SUMMARY

Because of the scientific and practical interest taken in mesenteric schistosomiasis of ruminanting and papular dermatitis of man, some biological and morphological characteristics of the cercaria of *Schistosoma bovis*, Sonsino 1876 obtained from *Bulinus contortus* collected in Sardina (Gallura and Baronia) were studied.

BIBLIOGRAFIA

Brumpt E. (1931): Prurit et dermatitis produit chez les nageurs par les cercaires de mollusques d'eau douce. *C. r. Acad. Sci. Paris, 193*, 253.

Brumpt E. (1931): Cercaria ocellata determinant la dermatite des nageurs provient d'une bilharzie des canards. *C. r. Acad. Sci. Paris, 193*, 612.

Bruckley J. J. C. (1938): On dermatitis in Malays caused by the cercaria of *Schistosoma spindalis*, Montgomery 1906, *Jour. Helm., 16*, 117.

Carta A. (1954): Dermatite papulare da cercarie di *Schistosoma bovis* nell'uomo. *La Ricerca Scientifica, 24*, 569-574.

Cort W. W. (1928): Schistosome dermatitis in the United States (Michigan). *Jour. Amer. Med. Assn., 90*, 1027-1029.

Cort W. W., Macmullen D. B., Olivier L. and Brackett S. (1940): Recent studies on schistosome dermatitis in the United States. *Rev. Med. Trop. y Paras., Bact. Clin., y Lab., 6*, 55.

Cort W. W. (1950): Studies on schistosome dermatitis. XI. Status of knowledge after more twenty yares., *Am. Jour. Hyg., 52*, 251.

Christenson R. O. and Greene W. P. (1938): Studies on the biological and medical aspects of « swimmer's itch », schistosome dermatitis in Minnesota. *Minn. Med.*, 573-575.

Deiana S. (1953): L'infestione del *Bulinus contortus* da cercarie di *Schistosoma bovis* e di *Paramphistomum cervi* in diverse stagioni dell'anno., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 29*, 1939-1940.

Edwards A. C. and Brackett S. (1938): Citati da Cort.

La Rue G. R. (1925): Schistosome dermatitis. *Mich. Public. Health. 23*, 87-90.

Macfarlane W. V. (1949): Schistosome dermatitis in New Zealand. I. The parasite. II. Patology and immunology of cercarial lesions. *Am. J. Hyg., 50*, 142-167.

Matheson C. (1930): Notes on *cercaria elvae*, Miller as the probable cause of an outbreack of dermatitis at Cardiff. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and. Hyg., 23*, 421-424.

NEUHAUS W. (1952): Biologie und Entwicklung von Trichobilharzia szidati n. sp. ecc. *Z. f. Paras. kunde 15*, 203.

PORTER A. (1938): The larval trematoda found in certain S. African mollusca with special reference to schistosomiasis (*Bilharziasis*). *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.*, *8*, 1.

SWALES W. E. (1936): Schistosome dermatitis in Canada. Notes on two causative agents and their snails hosts in Manitoba. *Can. J. Res.*, *14*, 6-10.

SZIDAT L. (1942): Was ist *Cercaria ocellata?* De La Vallette.... ecc. *Deutsch. Tropenmed. Z.*, *46*, 481.

TAYLOR E. S. and BAYLISS H. A. (1930): Observations and experiments on a dermatitis producing cercarie... ecc. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. London*, *24*, 219.

VOGEL H. (1930): Cercarien dermatitis in Deutschland. *Klin. Wschr. 9*, 883-886.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

L'*ANOPHELES ALGERIENSIS* THEOBALD IN SICILIA (*)

M. CEFALU' (**) e L. TERMINELLO (**)

L'esistenza nell'Isola di tre specie di anofeli e cioè, *Anopheles* (*Maculipennia*) *labranchiae* Falleroni, *Myzomyia* (*Neocellia*) *superpictus* Grassi e *Anopheles claviger* Meigen (=*bifurcatus* Auct.), messa in luce sin dalle prime osservazioni dovute a MANFREDI ed ai suoi collaboratori (1901-02), è stata confermata dagli osservatori successivi. Anche le estese ricerche condotte da BUONOMINI e collaboratori (1941-45) in alcuni settori dell'Isola dimostrarono una popolazione anofelica esclusivamente costituita dalle tre specie sopra menzionate.

In realtà, bisogna ricordare che, fino a poco tempo fa, le indagini entomologiche erano particolarmente rivolte allo studio degli anofeli vettori e responsabili dell'endemia e cioè, il *superpictus* e sopratutto il *labranchiae*, specie quest'ultima largamente diffusa e predominante in tutte le località malariche della Sicilia (BUONOMINI e MARIANI, 1946; D'ALESSANDRO, 1949).

Lo studio degli anofeli ad ali non macchiate apparve, invece, di minore interesse, dato che si era generalmente in presenza dell'*A. claviger*, il quale, almeno nel nostro ambiente, è ritenuto specie non vettrice o eccezionalmente implicata nella trasmissione.

Ma, con l'avvento del DDT ed il progressivo declino della malaria in Sicilia, ormai quasi del tutto estinta, gli studi sull'anofelismo sono entrati in una nuova fase, tuttora in via di svolgimento secondo un piano organico di ricerche. Tali ricerche, i cui primi risultati sono già stati resi noti (CEFALÙ, 1953; D'ALESSANDRO e collaboratori, 1954), hanno avuto, fra l'altro, come oggetto un esame approfondito della fauna anofelica residuata dopo i trattamenti con l'insetticida, indagando non soltanto sulla presenza e distribuzione delle specie già note, ma anche di altre eventuali specie non segnalate nell'Isola. Questo

(*) Le presenti ricerche fanno parte di un piano di studi eseguito sotto gli auspici e con il contributo dell'Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità.

(**) *Istituto d'igiene e microbiologia dell'Università di Palermo* (Direttore: Prof. G. D'ALESSANDRO).

processo di revisione ha mostrato la sua utilità, in quanto ha già portato alla identificazione in alcune località della Sicilia dell'*Anopheles algeriensis* Theobald, la cui segnalazione forma l'oggetto della presente nota.

Il riconoscimento dell'*A. algeriensis*, come risulta dalle descrizioni di vari autori (EDWARDS, 1920; CUBONI, 1926; LA FACE, 1929; DEL VECCHIO, 1940; MARIANI, 1952; AITKEN, 1953; etc.) e come noi stessi abbiamo constatato sugli esemplari catturati in Sicilia, si fonda precipuamente su alcune caratteristiche distintive rilevabili negli adulti e nelle larve.

Caratteristiche morfologiche distintive - Adulti: ali con squame grigio - scure uniformemente distribuite, senza formazione di macchie. Il mesonoto è bruno - rossiccio uniforme privo di chiazze di squame biancastre come si rileva nel *claviger* e nel *marteri* o scure come nel *plumbeus*. Manca il ciuffetto di squame biancastre sulla fronte, che si osserva nel *claviger*.

Le femmine hanno palpi più corti della proboscide, mentre nel *claviger* i palpi eguagliano la proboscide. L'ipopigio maschile è caratteristico. I lobi parabasali dei gonostili sono, infatti, muniti di una sola spina robusta impiantata su di un grosso tubercolo, mentre nel *claviger* le spine sono generalmente tre, di cui due ramificate.

Larve: al 1° stadio, setola subantennale molto più lunga dell'antenna e leggermente incurvata all'apice, quasi come nel *marteri* (maggiore accentuazione della curva apicale) e a differenza del *claviger*, nel quale la setola subantennale non supera l'antenna e all'apice si ripiega ad angolo. Le setole clipeali sono equidistanti l'una dall'altra, mentre nel *claviger* le due mediane sono leggermente più accostate.

Al 4° stadio, la differenziazione diventa sicura, basandosi principalmente sulle caratteristiche delle setole clipeali e delle setole palmate. Le prime assumono disposizione analoga a quella del *claviger* e del *marteri*, cioè setole clipeali interne più vicine l'una all'altra che alle esterne, ma se ne distinguono perchè presentano (specialmente le clipeali interne) nei due terzi distali numerosi ramuscoli piuttosto ordinatamente disposti. Le setole clipeali interne del *claviger* e del *marteri* sono, invece, lisce.

La setola palmata del 1° segmento addominale è rudimentale; quelle degli altri segmenti presentano 16-20 foglioline piuttosto larghe, con il contorno seghettato e l'estremità appuntita, a differenza del *claviger* che ha setole palmate con foglioline ad apice generalmente ottuso e contorno liscio o provvisto di dentellature scarse e poco accentuate.

Nella testa, fra il clipeo e la fronte, si distinguono tre bande trasversali chiare, mentre nelle larve di altre specie (*claviger*, *marteri*, etc.) si notano macchie più o meno isolate.

Pupa ed uova: le caratteristiche della pupa non sono molto distintive nei confronti di altre specie. Le uova sono in genere più piccole, più strette e più appuntite di quelle del *claviger*; i galleggianti sono piccoli e sollevati agli estremi, dal lato dorsale, a forma di corto manubrio; il colore è nero splendente.

Distribuzione geografica e abitudini di vita. — Malgrado sia stato talvolta trovato in paesi del Nord-Europa (Inghilterra, MARSHALL, 1938; Germania, WEYER, 1939), l'*A. algeriensis* è specie essenzialmente mediterranea. La sua presenza è stata, infatti, segnalata lungo tutto il bacino di questo mare, in Marocco, Penisola Iberica, Algeria, Francia, Corsica, Tunisia, Italia, Sardegna, Grecia, Turchia, Palestina ed altri paesi del Medio Oriente. Oltre che nei paesi mediterranei, esso è stato riscontrato con varia frequenza, in molte località dell'Asia del Sud e Centrale.

In Italia, la presenza dell'*algeriensis* è stata ripetutamente accertata nel Lazio (DEL VECCHIO, 1940; etc.), in Calabria (CUBONI, 1926), in Sardegna (SPANEDDA, 1940; AITKEN, 1953).

Osservazioni condotte di recente in Sardegna (AITKEN, 1953) fanno ritenere che questa specie non sverni soltanto allo stato di larva, ma continui la sua attività riproduttiva anche nei mesi freddi, se pure in misura molto ridotta. Agosto e settembre rappresentano l'epoca di massimo rigoglio.

L'*habitat* larvale dell'*algeriensis* è preferibilmente costituito da acque tranquille o in leggero movimento, limpide e piuttosto fresche. Le larve si sviluppano nei siti ricchi di vegetazione e ombrosi e si ritrovano spesso alla base di piante a fusto eretto, come canne, giunchi, etc. Nei focolai larvali della Sardegna è stato trovato frequentemente associato con il *labranchiae* e il *claviger*.

Gli adulti vivono all'esterno, ma sono anche frequentatori, sia pure occasionali, delle abitazioni umane e dei ricoveri animali.

L'importanza dell'*A. algeriensis* nella trasmissione della malaria è nell'insieme scarsa e quasi trascurabile.

Reperti di *Anopheles algeriensis* Theobald in Sicilia

Le prime osservazioni che hanno portato all'identificazione dell'*A. algeriensis* risalgono al luglio 1952. In tale periodo, venne sospettata la presenza di questa specie, esaminando alcuni anofeli ad ali non macchiate provenienti da Lentini (Siracusa) dove erano stati catturati sotto ponti, in grotte ed in ambienti disabitati nella zona del torrente Mulinello.

Dopo questo primo reperto, che valse a suscitare la nostra attenzione, le indagini furono approfondite ottenendo conferma della presenza dell'*algeriensis* non soltanto nella zona di Lentini, ma anche in quella relativamente vicina di Siracusa e del tutto recentemente a Pergusa, in provincia di Enna. Le catture, ripetute per tre anni consecutivi, comprendono un discreto numero di individui, adulti e larve in vario stadio di sviluppo, i quali mostrarono all'evidenza i caratteri distintivi della specie.

Riportiamo nella tabella alcuni dati relativi alle catture di alate di *A. algeriensis*.

TABELLA 1

Reperti di Anopheles algeriensis *Theobald in Sicilia.*

Data della cattura	Località	Ambiente	Numero di adulti
1952; Luglio	Lentini (Siracusa); zona torrente Mulinello.	ponti stradali; grotte; case disabitate	alcuni
1952; Dicembre	Siracusa	non precisato	alcuni
1953; Aprile	Lentini; contrada Renativo, fiume S. Leonardo	stalla non trattata con DDT	alcuni
1953; Maggio	Lentini; contrada sorg. Bagnara	abitazione rurale non trattata con DDT	alcuni
1953; 9 Novembre	Siracusa: zona fiume Anapo	stalla non trattata con DDT	2 (1♂)
» 17 »	»	»	2
» 24 »	»	»	3
» 3 Dicembre	»	»	2
» 4 »	»	»	2
» 10 »	»	»	4 (1♂)
1954; 21 Aprile	»	»	4 (1♂)
1954; Giugno	Pergusa (Enna)	capanna	2

Subito dopo il riconoscimento di alate di *algeriensis* abbiamo svolto alcune indagini dirette all'individuazione di focolai larvali della specie. A Lentini (Siracusa) sono stati esaminati alcuni ristagni ombreggiati, formati dal torrente



Fig. 1. - Siracusa, zona foce dell'Anapo. Veduta di insieme della località con il focolaio larvale e la stalla nella quale furono catturati adulti di *A. algeriensis*

Mulinello, dal fiume S. Leonardo e dalla sorgente Bagnara, in prossimità dei ricoveri nei quali erano state catturate alate, senza avere potuto dimostrarvi finora la presenza di larve di *algeriensis*.



Fig. 2. - Particolare della fig. 1: vegetazione intorno ad un focolaio larvale di *A. algeriensis*

La ricerca ha, invece, avuto esito positivo a Siracusa. I focolai larvali, posti nella zona della foce del fiume Anapo, in vicinanza di alcune saline ed a breve distanza dalla stalla dove si sono ripetute le catture di alate, sono costituiti da alcune pozze nelle quali si raccoglie l'acqua di piccole polle superficiali. In questi focolai (Fig. 1 e 2), che, per la relativa freschezza (10°-18°C) dell'acqua e il suo basso tenore in cloruro di sodio e l'abbondanza della vegetazione verticale, apparivano idonei alla vita acquatica dell'*algeriensis*, furono riscontrate le prime due larve il 23 dicembre 1953, contemporaneamente alla cattura di alcuni adulti nella vicina stalla. Successive ricerche condotte nell'aprile 1954 mostrarono numerose larve di *algeriensis* in vari stadi di sviluppo. Il reperto è stato anche positivo a Pergusa (Enna), dove nelle acque di una polla ombreggiata da alberi, in vicinanza del lago, furono pescate alcune larve nel giugno di quest'anno.

Nell'insieme, il materiale finora raccolto (adulti e larve), se vale a dare la certezza della presenza della specie in Sicilia, è ancora troppo scarso e limitato ad alcune singole località per una conoscenza anche sommaria della distribuzione stagionale dell'*A. algeriensis* e delle sue abitudini di vita nel nostro ambiente.

Va, comunque, rilevato (v. tabella) il frequente ripetersi del reperto di adulti, con qualche maschio, in una stalla posta presso la foce del fiume Anapo (Siracusa) nei mesi di novembre e dicembre, mentre ricerche insistenti eseguite nello stesso ambiente ed in altri possibili ricoveri della zona, a partire dal mese di aprile (quando il viciniore focolaio larvale era notevolmente attivo) e durante i mesi estivi del corrente anno, hanno fruttato soltanto quattro adulti catturati il 21 aprile.

Con ogni verosimiglianza, l'insuccesso delle ricerche nel periodo estivo deve porsi in rapporto con la predominante vita silvestre dell'*A. algeriensis* e con la sua maggiore tendenza a frequentare le abitazioni umane ed i ricoveri animali nella stagione sfavorevole.

Considerazioni

La dimostrazione dell'*Anopheles algeriensis* The. in Sicilia colma una lacuna nella regolare distribuzione di questa specie nel bacino del Mediterraneo, difficilmente giustificabile, essendo la nostra Isola posta lungo la linea di diffusione dell'*algeriensis* e quasi al centro di un insieme di terre (Algeria, Tunisia, Francia, Corsica, Sardegna, Penisola Italiana, Grecia), dove tale specie è da tempo ben conosciuta.

Indubbiamente, se tale lacuna si è mantenuta finora, ciò si deve massimamente al fatto che l'*algeriensis*, di cui sono note le difficoltà di rinvenimento e l'occorrenza sporadica anche in zone nelle quali trova condizioni favorevoli, è stato in Sicilia mascherato dalla soverchiante predominanza di altre specie

anofeliche. Come abbiamo anche accennato all'inizio di questa nota, la sua ricerca fra gli anofeli ad ali non macchiate e la distinzione dall'*A. claviger* non devono essere state approfondite di fronte all'interesse suscitato dalle due specie (*A. labranchiae* e *A. superpictus*) sostenitrici dell'endemia.

Apparentemente l'individuazione dell'*A. algeriensis* in Sicilia, dopo estesa applicazione del DDT, potrebbe significare che il rinvenimento di questa specie sia stato favorito dallo inetticida, nel senso che le sue possibilità di sviluppo siano migliorate in seguito alla riduzione degli anofeli dominanti nel nostro ambiente.

Si potrebbe, cioè, scorgere un primo accenno di sostituzione fra le specie che vivono nell'Isola, ricollegabile ad alcune modificazioni osservate nella fauna anofelica di altre regioni e cioè: l'espansione, a scapito dell'*A. labranchiae,* da parte dell'*A. hispaniola* e dell'*A. sacharovi* in Sardegna e dell'*A. claviger* nel Lazio e, inoltre, l'invasione di aree occupate dall'*A. superpictus* da parte dell'*A. claviger* in Grecia e di aree occupate dall'*A. sacharovi* da parte dell'*A. hyrcanus* nella valle del Giordano (5° Rapporto Comitato Esperti della Malaria, 1954).

Ma tale ipotesi non trova sufficiente sostegno nei risultati delle nostre indagini (Cefalù, 1953; D'Alessandro e collaboratori, 1954), attraverso le quali è stato dimostrato che l'*A. labranchiae*, l'*A. claviger* ed in misura minore l'*A. superpictus* occupano ancora il territorio dell'Isola, benchè fortemente scemati nel numero e ridotti, anche il *labranchiae,* a vita prevalentemente extra-domestica.

Il riscontro dell'*A. algeriensis* ci sembra, pertanto, da attribuire all'intensificazione delle indagini sull'anofelismo in questi ultimi anni ed alla loro estensione sistematica in zone prima non o solo insufficientemente esplorate. I nostri reperti attestano finora la presenza dell'*algeriensis* in alcune ristrette aree della Sicilia, fatto che ripete la caratteristica, più o meno chiaramente rilevata nei vari paesi in cui la specie è presente, e cioè la sua vita in *habitat localizzati.*

Evidentemente, la presenza dell'*A. algeriensis* in Sicilia, qualunque possano essere state in passato la sua diffusione e la densità nel territorio dell'Isola, assume dal lato epidemiologico modesto interesse, trattandosi di specie alla quale è riconosciuta partecipazione occasionale e praticamente irrilevante nella trasmissione.

Il reperto presenta, invece, significato per sè stesso, in quanto rivela un rappresentante finora ignorato della fauna anofelica siciliana e costituisce un incentivo per l'ulteriore studio degli anofeli che ancora vivono nell'Isola. Al riguardo appare significativo che il quadro dell'anofelismo si completi dopo ormai numerosi anni d'intenso impiego del DDT, il che offre ancora una conferma del fatto che la moderna lotta antianofelica, proteggendo le case e ogni rifugio costruito dall'uomo, ha interrotto la trasmissione e fatto cessare la ma-

laria nel nostro territorio, senza peraltro eradicare le specie anofeliche indigene e senza produrre sostanziali modifiche nei loro originari rapporti di coesistenza. L'*A. algeriensis* deve, infatti, ritenersi antico abitatore dell'Isola, al pari del *labranchiae*, del *superpictus* e del *claviger*, anche se, probabilmente in ragione del suo scarso sviluppo numerico, sia rimasto fino ad ora celato.

RIASSUNTO

Viene segnalata la presenza dell'*Anopheles algeriensis* Theobald in Sicilia, reperto che colma una lacuna nella distribuzione geografica di questa specie estendentesi a tutto il bacino del Mediterraneo.

Il suo rinvenimento è stato limitato finora ad alcune ristrette aree, fatto che appare in rapporto alla *localizzazione* di questa specie. Esso non è in relazione con fenomeni di sostituzione degli anofeli dominanti nell'Isola in seguito alla lotta con il DDT, ma è da attribuire all'intensificazione delle indagini sull'anofelismo nel corso di questi ultimi anni.

SUMMARY

The authors report the finding of *A. algeriensis* Theobald in Sicily. This finding fills a gap in the geographic distribution in this species which is distributed all through the Mediterranean area.

Its finding has been limited, until now, to some restricted areas, which agrees with the characteristic of this species.

This fact bears no relation to substitution phenomena with the other prevailing *Anopheles* species of the Island following DDT control, but should be considered as a consequence of the past years increased surveys.

BIBLIOGRAFIA

AITKEN T. H. G. (1953): The anopheline fauna of Sardinia; in, J. A. LOGAN, *The Sardinian project: an experiment in the eradication of an indigenous malarious vector*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1953.

BUONOMINI G. (1941): Aspetti del problema malarico nel quadro della colonizzazione del latifondo siciliano. *Riv. Ital. d'Igiene, 1*, 445.

BUONOMINI G. e MARIANI M. (1946): L'*Anopheles maculipennis* e l'anofelismo senza malaria in Europa; in, M. ASCOLI, *Nuove vedute sulla malaria*, Istituto Bibl. Italiano, Roma, 1946.

CEFALÙ M. (1953): Sulle tendenze extradomestiche (esofile) dell'*Anopheles labranchiae* in Sicilia. *Riv. di Malariologia*, 32, 213.

COMITÉ D'EXPERTS DU PALUDISME (1954): Cinquième rapport. OMS, *sèrie de rapports techniques*, N° 80.

CUBONI E. (1926): Osservazioni sulla biologia dell'*Anopheles algeriensis* e caratteri differenziali delle loro larve. *Riv. di Malariologia,, 5*, 49.

D'ALESSANDRO G. (1949): Aspetti dell'epidemiologia siciliana. *Ann. San. Pubb. 10*, 631.

D'ALESSANDRO G. (1954): Studio di un habitat montano dell'*Anopheles labranchiae* in Sicilia. *Riv. di Parassitologia*, 15.

D'ALESSANDRO G., CEFALÙ M., CRACOLICI M., DE GRAZIA G., GRASSI G. e MARIANI M. (1954): Ricerche su Malaria e Anofelismo in Sicilia. *Ann. San. Pubblica*, (in corso di stampa).

DEL VECCHIO G. (1940): Osservazioni sull'*A. algeriensis*. *Riv. di Parassitologia, 4*, 221

EDWARDS F. W. (1926): Una revisione delle zanzare delle regioni paleartiche. *Riv. di Malariologia, 5*, 253.

LA FACE L. (1929): Morfologia delle larve anofeliche e descrizione delle specie italiane. *Riv. di Malariologia, 8*, 538.

MANFREDI L. (1903): Secondo contributo allo studio della Malaria in Sicilia. *Boll. Soc. It. d'Igiene, 6*, (1-2).

MANFREDI L. (1926): La Malaria e la lotta antimalarica in Sicilia con speciale riguardo alla Sicilia occidentale. *Riv. San. Siciliana, 14*, (21).

MARIANI M. (1952): *Compendio di Entomologia medica*. Ed. Agap, Palermo, 1952.

MARSHALL P. F.: cit. da AITKEN in l. c.

SPANEDDA A. (1940): Tipi di anofelini esistenti in provincia di Cagliari *Rass. Med. Sarda, 42*, (1-5).

WEYER F.: cit. da AITKEN in l. c.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

NYMPHES DU PENTASTOME *GIGLIOLELLA* (N. GEN.) *BRUMPTI* (GIGLIOLI 1922) CHEZ UN LEMURIEN

ALAIN G. CHABAUD (*) et MARIE-THERESE CHOQUET (*)

Ce Pentastome trouvé à l'état adulte chez un Serpent (*Boa madagascariensis?*) et à l'état nymphal chez un Insectivore, le Tanrec (*Ericulus setosus*), a été décrit en 1922 par GIGLIOLI. Bien qu'ils l'aient classé dans le genre *Armillifer,* GIGLIOLI puis HEYMONS (1935) avaient remarqué que l'espèce avait des caractères qui la séparaient nettement des représentants africains et orientaux du même genre. Les données morphologiques complémentaires que nous avons pu obtenir sur notre matériel confirment cette notion et montrent même les affinités avec d'autres groupes. Il devient donc nécessaire d'isoler l'espèce dans un nouveau genre *Gigliolella* que nous dédions au Dr. GEORGE GIGLIOLI.

MATERIEL.

Trés nombreuses nymphes encapsulées dans le mésentère d'un *Cheirogaleus medius*. Envoyé au printemps 1953 par le Docteur R. PAULIAN, sous directeur de l'Institut Scientifique de Madagascar, le Lémurien a été conservé au laboratoire de Biologie médicale de la Faculté de médecine de Paris, et aprés un an de captivité, est mort d'une affection qui ne semble pas être liée à la présence du parasite; le Pr. F. BOURLIÈRE, et M.me A. PETTER-ROUSSEAUX, nous ont trés aimablement communiqué les parasites qu'ils avaient trouvés à l'autopsie.

DESCRIPTION.

Corps blanc, cylindrique, mais légèrement aplati sur sa face ventrale, long en moyenne de 22 mm. chez le mâle, et de 24 mm. chez la femelle, (Fig. 1). Le diamétre latéral reste d'environ 2 mm. sur les deux tiers antérieurs du corps, et ne diminue que trés progressivement dans la région caudale. Il existe environ 57 anneaux chez le mâle et 62 anneaux chez la femelle; les cinq premiers qui

(*) *Institut de Parasitologie. Faculté de Médecine de Paris.*

paraissent former le cephalo-thorax ne sont indiqués que trés légèrement sur la surface ventrale. Les annelures s'arrétent à environ 2 mm. de la pointe caudale qui est arrondie et trés faiblement bilobée à l'apex. Les lignes latérales ne sont pas visibles. La cuticule est ornée d'un cercle spinulé qui entoure chaque anneau au niveau de son sixiéme postérieur. La surface postérieure au cercle spinulé est lisse, alors que la surface antérieure à ce cercle est marquées de nombreuses petites fossettes circulaires (Fig. 2D).

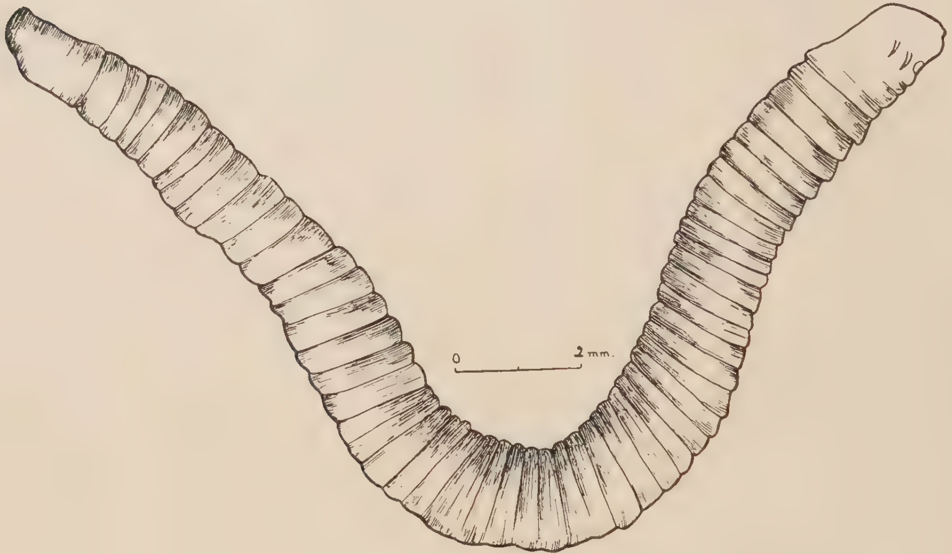


Fig. 1. - Vue latérale d'une nymphe de sexe mâle.

La bouche, presque circulaire en surface, est entourée, en profondeur, latéralement et postérieurement d'un renforcement en forme de fer à cheval (Fig. 2A). Les 4 crochets, situés sensiblement au même niveau que la bouche (Fig. 2E), sont égaux (Fig. 2B). Ils sont longs de 350 μ et sont articulés sur 2 appareils de soutien chitineux. L'un pour l'insertion des muscles d'extension comprend une longue pièce en gouttiére prolongée par 2 cornes antérieures plus fortement chitineuses, et l'ensemble est long de 450 μ (Fig. 2C); l'autre, destinée à l'insertion des muscles de flexion a la forme d'un batonnet long de 125 μ. 3 paires de papilles sensorielles font saillie sur la calotte céphalique; l'une, trés grosse, en forme de dôme, est subapicale; les deux autres, plus petites, sont étagées le long du bord lateral, en avant des crochets.

L'orifice génital mâle est situé entre le 3éme et le 4éme anneau céphalique, à 1 mm. en arriére de la bouche. L'orifice génital femelle s'ouvre sur le dernier anneau caudal à environ 1 mm. du bout de la queue. L'anus est terminal et s'ouvre au fond des deux petit lobes (l'un dorsal, l'autre ventral), qui marquent l'extrémité caudale.

On ne distingue guère dans l'anatomie interne qu'un tube digestif simple, étroit en avant et dilaté en arrière, et de très grosses glandes salivaires occupant le tiers antérieur du corps.

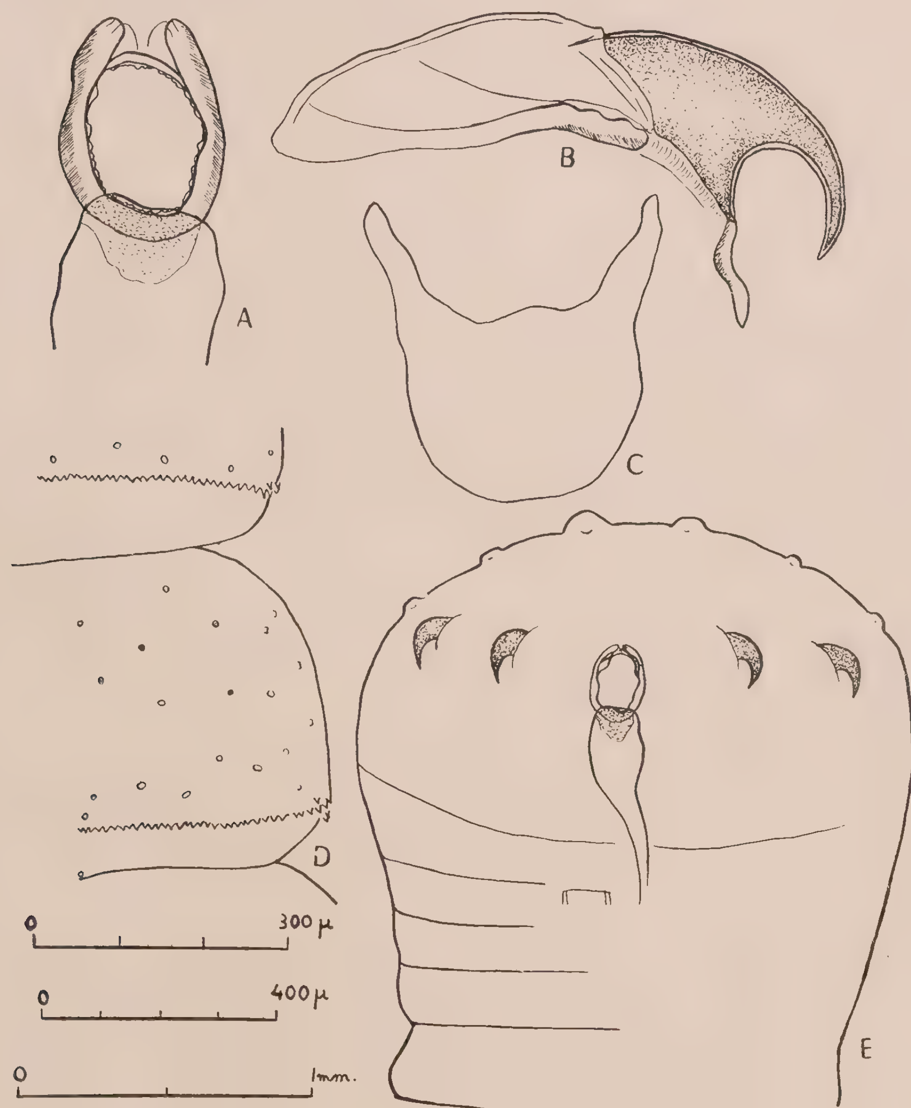


Fig. 2. – A. Bouche et cadre buccal (mâle). Echelle 0-300. μ

B. Vue latérale d'un crochet interne. (mâle). Echelle 0-300 μ

C. Vue ventrale de l'appareil d'insertion des muscles extenseurs des crochets. Echelle 0-300 μ

D. Detail de la cuticule d'un bord latéral. Vue ventrale. (mâle). Echelle 0-400 μ

E. Extrémité céphalique. Vue ventrale. (mâle). Echelle 0-1 mm.

Discussion.

L'espèce correspond parfaitement bien à la description d'*Armillifer brumpti,* et nous avons pu confirmer cette détermination par la comparaison avec le matériel original déposé à l'Institut de Parasitologie de la Faculté de médecine de Paris.

Les données complémentaires que nous pouvons apporter sur la structure buccale et sur les caractéres de la cuticule existent également sur les spécimens de Giglioli, mais ils n'apparaissent qu'après un fort éclaircissement dans le chloral-lacto phénol.

Giglioli, tout en placant son espèce parmi les *Armillifer* remarque qu'elle s'oppose aux autres représentants du genre: « j'ai observé dans ce nouveau parasite des caractéristiques tout à fait particulières, telles que le type de la segmentation, l'extrémité postérieure claviforme, la longueur du dernier anneau, qui le différencient et le séparent des autres espéces africaines et orientales du même genre: *A.armillatus; A.moniliformis; A.annulatus* ». Heymons (1935, p. 243) remarque également que le nombre élevé des anneaux et la forme non parfaitement circulaire de la bouche, chez les adultes, séparent *A.brumpti* des autres espèces. Il convient d'ajouter maintenant que le cadre buccal en forme de fer à cheval et l'ornamentation de la cuticule rappellent ce que l'on observe chez certains *Sebekiinae* et non chez les *Porocephalinae*. De la même façon, l'éloignement de la vulve et de l'anus separe l'espèce des *Porocephalinae* et marque une étape vers les genres hétérogynes (1) (*Sambonia, Elenia, Waddycephalus* et *Ligamifer*) que Heymons (1942) rapproche dans la famille des *Sambonidae.*

Comme dans la cas de *Ligamifer,* nous voyons que ce nouveau genre reste trés proche d'*Armillifer,* mais qu'il présente d'incontestables affinités avec des espèces plus primitives parmi les *Samboninae* et même parmi les *Sebekiinae.*

Nous proposons donc de ranger le genre *Gigliolella* parmi les *Porocephalidae* et de le séparer des autres espèces par la définition suivante:

Corps cylindrique, mais aplati ventralement, formé de nombreux anneaux (environ 60) qui diminuent progressivement de diamètre dans le tiers postérieur du corps. Cuticule avec cercles spinulés et formations en fossettes. Pas de lignes latérales. Extrémité caudale claviforme, terminée par un très long anneau portant l'anus terminal entre deux petits lobes apicaux (l'un ventral et l'autre dorsal). Tête arrondie dorsalement, aplatie et légérement concave ventralement, séparée du corps par un léger amincissement. 4 crochets égaux disposés sur une ligne presque droite au même niveau que la bouche. Bouche presque circulaire en surface, mais cavité buccale renforcée par une formation chitineuse en forme de fer à cheval. Intestin droit. Ouverture génitale

---

(*) On sait qu'une espéce hétérogyne a une ouverture vaginale nettement préanale, mais toujours séparée de l'anus par un espace de plusieurs segments abdominaux complétement développés. (Heymans 1935, p. 90).

femelle nettement éloignée de l'anus, mais n'en étant cependant séparée par aucun anneau complétement formé.

Le genre qui semble spécial à Madagascar, évolue à l'état nymphal chez des Mammifères et à l'état adulte chez des Serpents.

REMERCIEMENTS.

Nous remercions vivement notre Maitre R. PH. DOLLFUS pour toute l'aide qu'il nous a apporté dans cette étude.

RESUME

L'espèce *Armillifer brumpti* décrite par GIGLIOLI en 1922 a été retrouvée à l'état nymphal chez un Lémurien. Nous donnons quelques éléments morphologiques complémentaires qui indiquent des affinités avec des espéces plus primitives que les *Armillifer*. Le parasite reste proche du genre *Armillifer* mais s'en distingue :

1° - Par une segmentation moins forte.

2° - Par des anneaux plus nombreux.

3° - Par un cadre buccal en fer à cheval qui rapelle les *Sebekiinae*.

4° - Par une extrémité postérieure en forme de grosse olive non segmentée, qui fait que l'orifice génital femelle, bien qu'il ne soit séparé de l'anus par aucun anneau bien formé, en est cependant aussi distant que chez certains *Sambonidae*.

5° - Par le fait que l'espece semble spéciale à Madascar.

Nous avons crée pour elle le nouveau genre *Gigliolella*.

RIASSUNTO

Armillifer brumpti, descritta da GIGLIOLI nel 1922, è stata ritrovata allo stato di ninfa in un Lemuride. Riferiamo alcuni elementi morfologici complementari che dimostrano certe affinità con specie più primitive degli *Armillifer*. Il parassita in questione è prossimo al genere *Armillifer*, ma se ne differenzia :

1° - Per la segmentazione meno accentuata.

2° - Per il maggior numero delle anulazioni.

3° - Per l'aspetto dell'apertura boccale, a ferro di cavallo, che ricorda le *Sebekiinae*.

4° - Per l'estremità posteriore a forma di grossa oliva insegmentata, ciò che fa sì che l'orificio genitale femminile, benchè non separato dall'ano da alcun anello ben formato, ne sia tuttavia distante quanto in certi *Sambonidae*.

5° - Perchè la specie sembra esclusiva del Madagascar.

Abbiamo pertanto creato per essa il nuovo genere *Gigliolella*.

SUMMARY

Armillifer brumpti GIGLIOLI 1922 was found again (nymphal stage) in Lemuroid. We describe some morphological features which demonstrates some affinities whith more primitive species than the *Armillifer*.

The parasite may be classified close the genus *Armillifer* but differs from it by :

1° - The annulation is not so conspicuous.

2° - Grater number of annulations.

3° - A chitinous oral armature which recalls of that of the *Sebekiinae.*

4° - The posterior extremity enlarge in a big non segmented olive-shaped. Female genital opening, although not separated from anus by any well formed segment, is remote as it is in some *Sambonidae.*

5° - The species has been exclusively found in Madagascar.

We proposed for it the new genus *Gigliolella.*

BIBLIOGRAPHIE

GIGLIOLI (1922): *Armillifer Brumpti* n. sp., nouvelle espèce de Linguatulidé de Madagascar. *Bull. Soc. Path. Exot., XV*, 565-572.

HEYMONS R. (1935): *Pentastomida.* Bronns Tierreichs. V Abt. IV, Liv. 1.

HEYMONS R. (1942): Beiträge zur Systematik der Pentastomidem IV. Zur Kenutnis der *Sambonidae. Zeitsch. f. Parasit., XII*, 317-329.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SU ALCUNI ASPETTI MORFOLOGICI DI *COWDRIA RUMINANTIUM*

V. CILLI (*) e G. CORAZZI (*)

Le rickettsie costituiscono un gruppo di microrganismi la cui posizione sistematica sembra avere raggiunto, in questi ultimi anni, un assetto soddisfacente.

Il genere *Rickettsia* è stato creato da DA ROCHA LIMA (13) nel 1916 per indicare l'agente del tifo classico (*R. prowazekii*). Nel 1919 WOLBACH (35) istituisce il nuovo genere *Dermacentroxenus* per la designazione della rickettsia della Febbre maculosa delle Montagne Rocciose (*D. rickettsii*) e nel 1920 WOLBACH e TODD (36) attribuiscono ad esso anche la rickettsia del tifo Messicano chiamandola *Dermacentroxenus typhi.*

Con la descrizione di altre specie di rickettsia, che vennero designate dai varî autori con l'uno o con l'altro nome, si è venuto a creare un certo confusionismo nella nomenclatura di questi microrganismi alla cui definizione ha con tribuito la BENGSTON (4) mediante la proposta, accettata dagli autori moderni, di incorporare il genere *Dermacentroxenus* nel genere *Rickettsia.*

Sulla natura delle rickettsie vi è stato in passato un certo disaccordo che va tuttavia componendosi col progredire degli studi e delle conoscenze nel campo della microbiologia.

BRUMPT (6) considera le rickettsie di probabile natura protozoaria e le pone fra i parassiti ad affinità incerta, accanto ai generi *Bartonella, Eperythrozoon, Grahamella, Toxoplasma;* NEVEU-LEMAIRE (26) segue un analogo criterio di classificazione includendo fra i parassiti ad affinità incerta oltre il genere *Rickettsia* anche i generi *Toxoplasma, Ovoplasma, Neuroplasma* e *Miyagawanella,* riservando quest'ultimo al virus della linfogranulomatosi inguinale dell'uomo; CARPANO (9), nel riportare le caratteristiche di alcune rickettsie rinvenute negli uccelli, accenna ad aspetti morfologici di tali parassiti che ricordano tanto i gametociti ed i *corpi plasmatici* di *Theileria parva* quanto le forme triangolari e a croce di *Nuttallia equi;* LEVADITI C. e LEVA-

(*) *Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria dell'Università di Perugia - Centro di Studio per le Zoonosi del C.N.R.* (Direttore: Prof. V. CILLI).

DITI J. C. (23) creano un nuovo gruppo di microrganismi, denominato *Pararickettsia miyagawae*, per includervi i virus del gruppo psittacosi-linfogranuloma notoriamente assai prossimi alle rickettsie.

Nella 6ª edizione del « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » (5) le rickettsie vengono assegnate all'ordine *Rickettsiales* di cui fanno parte le famiglie *Rickettsiaceae, Bartonellaceae* e *Chlamydozoaceae*. Le prime due famiglie sono costituite da parassiti intracellulari, trasmissibili mediante artropodi, dotati di affinità biologica rispettivamente per le cellule dei tessuti e per gli eritrociti; la terza famiglia invece comprende parassiti intracellulari che differiscono dalle rickettsie e dalle bartonelle per il solo carattere di non essere trasmessi da artropodi. La famiglia *Rickettsiaceae* è suddivisa nei tre generi *Rickettsia, Coxiella* e *Cowdria*. I primi due da un lato e il terzo dall'altro differiscono solo per la diversa morfologia dei parassiti: bacillare, ellissoidale, coccoide nei generi *Rickettsia* e *Coxiella;* sferica e occasionalmente allungata nel genere Cowdria. Per quanto attiene la differenziazione fra rickettsie e coxielle, questa è basata sul carattere della filtrabilità, assente nelle prime e presente nelle seconde. La famiglia *Chlamydozoaceae* si suddivide nei tre generi *Chlamydozoon, Miyagawanella* e *Colesiota*. Il primo genere comprende l'agente del tracoma mentre il secondo le varie specie di virus del gruppo psittacosi-linfogranuloma. Il carattere distintivo fra i due generi è rappresentato dalla coltivabilità su embrione di pollo che può essere utilizzato solo per i virus del genere *Miyagawanella*. Il genere *Colesiota* è stato creato per gli agenti della congiuntivite dei ruminanti e degli uccelli e racchiude in sè parassiti dotati di uno spiccato polimorfismo (forme coccoidi, triangolari, bacillari, anulari) che li differenzia da quelli di aspetto per lo più coccoide appartenenti ai generi *Chlamidozoon* e *Miyagawanella*. In appendice al capitolo della famiglia *Rickettsiaceae* vi è un elenco di rickettsie, fra cui figurano *R. quintana, R. bovis, R. canis, R. ovina, R. melophagi, R. suis* e *R. weigli*, non ancora definite dal punto di vista della sistematica in attesa di ulteriori conoscenze intorno alla loro biologia.

Gli autori moderni, interessati alla classificazione delle rickettsie, pongono tali microrganismi in una posizione intermedia fra i batteri più piccoli, coltivabili su terreni artificiali di cultura, e gli ultravirus del gruppo psittacosi-linfogranuloma. Le rickettsie infatti hanno in comune con i batteri le notevoli dimensioni, che le rendono visibili al microscopio ottico, la incapacità, ad eccezione di *C. burnetii*, di attraversare i filtri e la sensibilità di fronte ad alcuni antibiotici; d'altra parte rassomigliano ai suddetti virus per lo spiccato parassitismo intracellulare mentre se ne differenziano per possedere la prerogativa di trasmettersi agli animali e all'uomo mediante artropodi.

Alcuni AA. (TOPPING - 32; STUART-HARRIS - 31; MARIANI - 25, ecc.) seguono un criterio di classificazione delle rickettsie basato sulle caratteristiche epidemiologiche, patologiche e sierologiche presentate dalle corrispondenti forme

morbose altri (Curasson - 12; Donatien e Lestoquard - 14) invece suddividono i parassiti in base alla natura delle cellule colpite. Le rickettsiosi dell'uomo e degli animali vengono così comprese nei seguenti schemi:

Rickettsiosi dell'uomo

1) gruppo del tifo: *R. prowazekii, R. typhii;*
2) gruppo della febbre maculosa: *R. rickettsii, R. conorii;*
3) gruppo del tsutsugamushi: *R. tsutsugamushi;*
4) gruppo della febbre Q: *C. burnetii.*

Rickettsiosi degli animali (1)

1) rickettsie delle cellule epiteliali: *R. conjunctivae, R. conjunctivae galli;*
2) rickettsie del sistema reticolo-endoteliale:
   a) r. delle cellule endoteliali: *R. ruminantium;*
   b) r. dei monociti: *R. canis, R. ovina, R. bovis;*
   c) r. dei monociti e delle cellule endoteliali: *R. psittaci* (?), *R.* (*Grahamella*) *gallinarum, R. avium.*

Le rickettsie sono dei piccoli microrganismi polimorfi, il cui aspetto varia a seconda della specie di appartenenza e della sede nella quale esse si trovano (tessuti e liquidi organici di mammiferi e di artropodi, colture di tessuti in vitro, embrioni di pollo). Possono presentarsi in forma coccoide (micron 0,2-0,5 di diametro), ellissoidale, ovoide, bacillare (micron 0,2-0,3 $\times$ 0,4-2) e filamentosa. Gli elementi coccoidi, così come quelli bacillari, si dispongono spesso a coppie assumendo talora un aspetto lanceolato che ricorda quello caratteristico dei pneumococchi. Nelle colonie intracellulari, costituite da numerosi elementi, le rickettsie hanno per lo più un aspetto finemente granuloso. Le forme bacillari assumono spesso una colorazione bipolare simile a quella presentata dalle pasteurelle. In casi particolari, riguardanti gli artropodi infetti, acquistano la forma di manubrio o di clava. Le forme filamentose (fino a micron 25-40) si osservano occasionalmente in alcune specie di rickettsie (*R. prowazekii R. typhii, C. burnetii*) e difficilmente posseggono una struttura uniforme; il più delle volte sono caratterizzate dalla presenza di interruzioni costituite da zone chiare le quali conferiscono al filamento, in tutto o in parte, un aspetto streptobacillare.

In alcune rickettsie, che interessano particolarmente la patologia animale, sono state descritte forme anulari, a virgola, a triangolo e a ferro di cavallo di particolare significato e importanza. Babudieri (1), studiando lo sviluppo di *R. prowazekii* nell'embrione di pollo, osserva delle forme clavate e fusate (micron 2,5 $\times$ 14) alle quali attribuisce il significato di aspetti degenerativi

---

(1) In questo schema, riportato da Curasson (12), non viene compresa la *C. burnetii*, agente della febbre Q degli animali.

che possono riscontrarsi nel parassita quando questo viene a trovarsi in un ambiente embrionale inadatto.

Le osservazioni al microscopio elettronico (Babudieri e Bocciarelli -2; Weiss -34; Plotz, Smadel, Anderson e Chambers -27; Eigelsbach, Chambers e Coriell -17; Eyer e Ruska -18; Shepard e Myckoff -29; van Rooyen e Scott -33) hanno rivelato una grande analogia di struttura fra rickettsie e batteri. Infatti, a somiglianza di quest'ultimi, le rickettsie presentano una membrana cellulare e un citoplasma che appare sotto forma di una massa opaca scarsamente permeabile alle radiazioni elettroniche. Nel citoplasma si rinvengono delle granulazioni talora così piccole da rendere possibile, secondo Levaditi (24), il loro passaggio attraverso le candele di porcellana.

Ciò che ravvicina le rickettsie ai batteri è anche il polimorfismo della loro struttura il quale contrasta invece con l'uniformità presentata dai virus. In *R. prowazekii* Babudieri e Bocciarelli (2) hanno osservato forme rotondeggianti, ovoidali, allungate, a catena e filamentose. La forme in divisione sono contrassegnate da una maggiore lunghezza del corpo cellulare e dalla presenza, sia nella massa opaca centrale che nella membrana, di una strozzatura la quale prelude la separazione delle due cellule figlie. Secondo Levaditi (24) gli aspetti polimorfi presentati dalle rickettsie al microscopio elettronico deporrebbero in favore della esistenza di un ciclo di sviluppo sul modello di quello descritto da Sikora (30) di cui parleremo. Babudieri (3) non condivide tale opinione ritenendo che il ciclo delle rickettsie è relativamente semplice e in complesso corrispondente a quello dei comuni schizomiceti.

Il ciclo evolutivo delle rickettsie è stato studiato da numerosi ricercatori che ne hanno descritto le varie fasi senza giungere ad un completo accordo. Secondo Da Rocha-Lima (13), che per primo si è occupato dell'argomento, la suddivisione della rickettsia è preceduta da una fase in cui il corpo del parassita si allunga, quindi si assottiglia nella parte mediana assumendo il caratteristico aspetto a manubrio che, pure essendo frequente in *R. prowazekii*, costituisce uno stadio transitorio del parassita. Carpano (9), Donatien e Lestoquard (15-16), Foley e Parrot (19) studiando il ciclo evolutivo di alcune rickettsie patogene per l'uomo (*R. trachomatis*, *R. conorii*) e per gli animali (*R. avium*, *R.* (*Grahamella*) *gallinarum*, *R. conjunctivae*, *R. canis*, *R. bovis*, *R. ovina*, *R. ruminantium*) descrivono delle formazioni equivalenti ai «*Corpi iniziali*» e ai «*Corpi elementari*» di Lindner costituite rispettivamente da parassiti arrotondati, più o meno voluminosi (da 1-2 fino a 5-20 micron) e da elementi più piccoli (da 0,1 a 3 micron) di aspetto granulare, coccoide, ellissoidale, anulare ecc. Dette formazioni rappresenterebbero le fasi estreme del ciclo evolutivo e sarebbero collegate da elementi a morfologia svariatissima da interpretarsi come forme di passaggio del ciclo stesso.

Secondo Giroud e Panthier (20) la *R. prowazekii* attraversa nel tessuto polmonare diversi stadi di sviluppo prima di assumere la morfologia tipica

della specie. Questi stadi sono stati definiti dagli AA. con diversi nomi (corpi granulosi, corpi omogenei, inclusioni, corpi puntiformi) e corrisponderebbero alle diverse fasi di adattamento della rickettsia all'organismo dell'ospite.

Questi schemi, riguardanti il ciclo evolutivo delle rickettsie, sono stati criticati da SIKORA (30) secondo il quale i « *Corpi iniziali* » ed i « *Corpi elementari* » osservati specialmente nella cherato congiuntivite dei ruminanti sono formazioni di natura ancora imprecisata mentre le inclusioni di GIROUD e PANTHIER (20) devono essere considerate come formazioni di natura specifica-aspecifica dell'organismo infetto quando non si tratti di microcolonie del parassita. SIKORA (30) così descrive il ciclo evolutivo delle rickettsie: l'elemento base è il granulo nucleare che si divide in due tenuti insieme da sostanza protoplasmatica (forma a manubrio come si osserva più frequentemente nella *R. prowazekii*); i due granuli possono dividersi a loro volta formando elementi a quattro granuli che dividendosi a metà danno due elementi a manubrio o, perduta tutta la parte protoplasmatica, ritornano alla forma granulare (MARIANI -25). Come abbiamo già detto, BABUDIERI (3) non conferma le osservazioni degli studiosi che hanno descritto i vari cicli evolutivi delle rickettsie, ritenendo che « lo sviluppo delle rickettsie nel polmone avvenga presumibilmente per scissione semplice trasversale, senza passare attraverso particolari stadî (come vorrebbe SIKORA (30)); granuli e catene sarebbero semplicemente espressione della difficoltà di sviluppo del parassita ».

RICERCHE PERSONALI

In occasione di alcuni focolai di idropericardite dei ruminanti (*Heart-water*) osservati in Eritrea dal 1940 al 1947, abbiamo avuto la possibilità di raccogliere del materiale patologico da pecore naturalmente infette e di constatare come il sistema nervoso centrale di detti animali rappresentasse un materiale di scelta per lo studio morfologico, al microscopio ottico, di *C. ruminantium*. Con detto materiale infatti si potevano allestire dei preparati per istriscio i quali, opportunamente fissati e colorati, si mostravano assai ricchi di parassiti la cui struttura era apprezzabile in modo assai più chiaro di quanto non apparisse nei preparati istologici e negli strisci allestiti con l'endotelio dei grossi vasi. Un metodo analogo è stato usato nel Kenia anche da PURCHASE (28). Rendiamo conto in questa nota dei risultati conseguiti nelle nostre ricerche che sono state effettuate nell'intento di portare un contributo allo studio della morfologia di *C. ruminantium* nel S.N.C. degli animali ammalati

MATERIALE E TECNICA

a) *Animali.* — Erano rappresentati da ovini di razza locale provenienti da due focolai di idropericardite infettiva verificatisi rispettivamente nei territori di Cheren (Af Abed) e dell'Hamasien (Tzada Cristian). La malattia aveva colpito una forte percentuale di animali determinando una mortalità elevata. Clinicamente era caratteriz-

zata dai seguenti sintomi: temperatura elevata (fino a 42°C.), congestione delle mucose apparenti, abbattimento, arresto della ruminazione, anoressia, dispnea, tachicardia e andatura barcollante. A differente distanza dalla comparsa dei primi sintomi si manifestavano delle crisi nervose a carattere eccitativo, la cui frequenza aumentava nelle forme più gravi fino alla morte che avveniva dopo un decorso variabile da due a sei giorni. Le lesioni riscontrate alla necroscopia erano quelle abituali dell'idropericardite infettiva: congestione vasale nel sottocutaneo; presenza di liquido sieroso o siero-emorragico, facilmente coagulabile, nelle cavità addominale, pleurica e pericardica; gastro-entrite acuta catarrale con presenza di emorragie e di erosioni superficiali alla mucosa dell'abomaso e dell'intestino; patosi torbida al fegato e al rene; lieve tumore di milza con follicoli iperplasici ed emorragie sottocapsulari; edema polmonare; cuore degenerato con emorragie sottoepicardiche e sottoendocardiche; sangue coagulato; linfonodi, specie i meseraici, ingrossati, succosi, congesti, talora emorragici; emorragie puntiformi nella sostanza bianca e grigia del cervello, cervelletto e midollo. Sulla cute degli animali sono stati rinvenuti esemplari di zecche appartenenti alla specie *Amblyomma variegatum* che figura tra i trasmettitori di *C. ruminantium*. La malattia è stata riprodotta sperimentalmente in pecore e capre.

b) *Allestimento e colorazione dei preparati.* — I preparati sono stati allestiti dal cervello subito dopo il decesso dell'animale. La scatola cranica veniva aperta con tecnica appropriata onde procedere alla estrazione del cervello che era posto in una scatola di vetro sterile. Eseguite le colture su terreni in aerobiosi e anaerobiosi, si procedeva al prelevamento, mediante bisturi sterile, di piccoli pezzi delle dimensioni di una lenticchia, dalla corteccia cerebrale e con l'ausilio di vetrini portaoggetti accuratamente puliti e sgrassati si effettuava lo striscio, il più possibile sottile, determinando in un primo tempo lo schiacciamento del materiale ed in seguito lo scorrimento di un lato corto del vetrino superiore sulla superficie di quello inferiore ad una inclinazione di circa 25-30°.

Dopo essiccamento del materiale all'aria e fissazione per 5' con alcool jodato (alcool a 95° 98 parti, tintura di jodio 2 parti), lo striscio veniva colorato per 30' mediante la soluzione seguente, proposta da DONATIEN e LESTOQUARD (16) per le rickettsie: acqua 1cc., Giemsa 3 goccie, May Grünwald 3 goccie, e, successivamente, lavato in acqua corrente e asciugato in termostato.

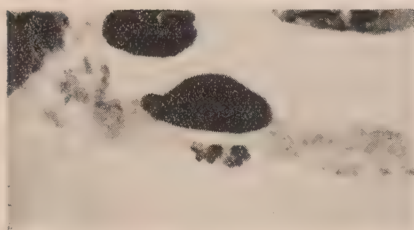
Le nostre osservazioni sono state effettuate su strisci provenienti da animali il cui cervello risultava sterile alle prove colturali. Il materiale di studio è stato prelevato dalla corteccia cerebrale perchè tale regione, secondo quanto riferisce COWDRY (28), costituisce, dopo il rene, la sede più ricca di parassiti e ciò analogamente a quanto si verifica nelle cavie infettate sperimentalmente con *R. prowazekii* (WOLBACH, TODD e PALFREY - 37).

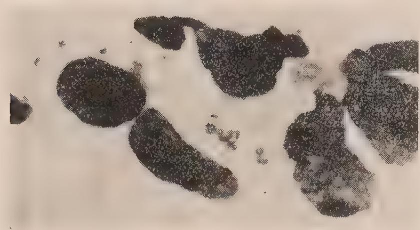
L'osservazione al microscopio ottico dei preparati allestiti con la tecnica suddetta è notevolmente più facile di quella diretta sugli strisci allestiti con l'endotelio dei grossi vasi. A prescindere dalla maggiore quantità di parassiti presenti nella corteccia cerebrale, la loro reperibilità in questa sede richiede pochi minuti di tempo se si ha l'avvertenza di eseguire l'esame dei capillari con obbiettivo ad immersione dopo averne individuata la sede a piccolo ingrandimento.

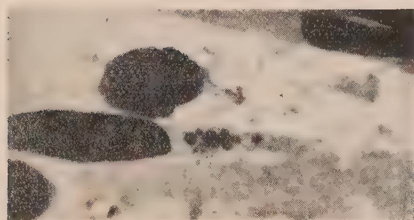
Tav. I - *Cowdria ruminantium* (X 1200 circa) - Figg. 1-2. Cellula endoteliale invasa da elementi parassitari coccoidi. - Fig. 3. Rickettsie di forma coccoide e anulare. - Fig. 4. In questo piccolo gruppo di parassiti si vedono distintamente oltre alcuni anelli, un elemento a U ed una forma bacillare. - Figg. 5-6. Piccoli ammassi di parassiti coccoidi e anulari. - Fig. 7. Cellula endoteliale contenente due colonie di cui la grande costituita prevalentemente da anelli e la piccola da forme coccoidi e bacillari. - Fig. 8. In questa figura si nota la diffusione delle rickettsie lungo la parete del capillare. - Fig. 9. Piccolo ammasso di parassiti di forma bacillare. - Fig. 10. Le rickettsie hanno determinato una depressione del nucleo.

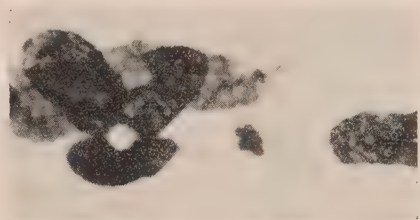

Fig. 1

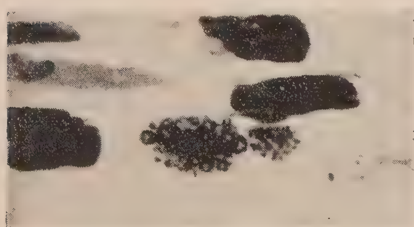

Fig. 2

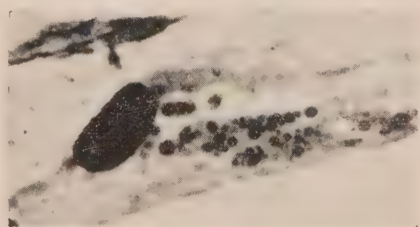

Fig. 3


Fig. 4


Fig. 5


Fig. 6


Fig. 7


Fig. 8

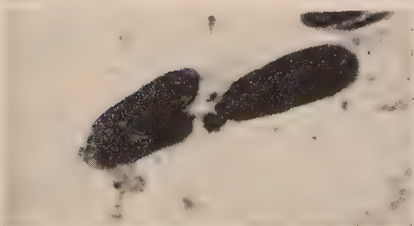

Fig. 9


Fig. 10

Risultati

1) *Morfologia dei parassiti.* — Come gli altri componenti della famiglia delle *Rickettsiaceae,* anche *C. ruminantium* presenta uno spiccato polimorfismo caratterizzato dai seguenti gruppi di elementi: a) coccoidi; b) coccobacillari e bacillari brevi; c) anulari.

a) *Elementi coccoidi* (Figg. 1-2-16-18-19-20-22-23-24-26). — Si rinvengono isolati, appaiati o a gruppi. Questi ultimi contribuiscono, in tutto o in parte, alla formazione delle colonie di tipo morulare caratterizzando l'aspetto più tipico del parassitismo intracellulare proprio delle rickettsie. Hanno un diametro variabile da micron 0,2 a micron 0,5. Queste dimensioni sembrano in rapporto con lo stadio di sviluppo in cui si trova il parassita, infatti le forme grandi prevalgono negli ammassi, simili a rosette, costituiti da poche rickettsie mentre le piccole si rinvengono con maggiore frequenza nelle colonie più sviluppate alla cui formazione essi partecipano insieme a rappresentanti di altri gruppi morfologici fra i quali figura sempre quello delle forme ad anello, complete o incomplete.

Le forme coccoidi, trattate col metodo di Donatien e Lestoquard, assumono una colorazione violetta più o meno intensa sebbene non manchino casi, assai rari invero, in cui appaiono di colore rosso porpora. In entrambi i casi riposano quasi sempre su un fondo colorato leggermente in bleu che costituisce una specie di ganga entro cui si svolge il ciclo del parassita.

b) *Elementi coccobacillari e bacillari brevi* (Figg. 4-7-9-22). — Si ritrovano specialmente nelle colonie intracellulari in via di formazione, mescolati alle forme anulari, coccoidi, a ferro di cavallo ecc. Hanno dimensioni oscillanti da micron 0,2-0,3 di spessore a micron 0,6-0,8-1 di lunghezza e si colorano in viola più o meno intensamente. Le forme coccobacillari assumono talora un aspetto bipolare mentre le bacillari brevi appaiono diritte o ricurve, clavate o a manubrio, a U, isolate, appaiate o riunite in gruppi disponendosi, in quest'ultimo caso, a palizzata come i corinebatteri.

Non abbiamo mai osservato forme bacillari lunghe e forme filamentose.

c) *Elementi anulari* (Figg. 3-5-6-7-8-11-12-13-14-20-21-22). — Costituiscono l'aspetto più caratteristico di *C. ruminantium.* Hanno dimensioni piccole (micron 0,3-0,4), medie (micron 0,6-1) e grandi (micron 1,3-2) e si rinvengono in quasi tutti gli ammassi intracellulari ove sono più o meno

---

Tav. II - *Cowdria ruminantium* (X 1200 circa) - Fig. 11. Diffusione delle rickettsie lungo la parete del capillare. - Figg. 12-13-14-16. Ammassi di parassiti costituiti in prevalenza da forme coccoidi, anulari complete e anulari incomplete. - Fig. 15. In basso a destra si nota una forma anulare con sepimento trasversale. - Fig. 17. In questo piccolo ammasso di rickettsie spicca una forma ad anello, di grandi dimensioni, contenente tre formazioni di tipo sporale. - Figg. 18-19. Intenso parassitismo che autorizza l'ipotesi di una diffusione per contiguità della rickettsia alle cellule degli endoteli vasali.

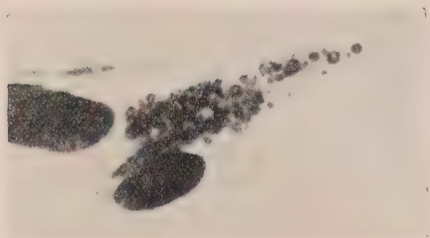


Fig. 11

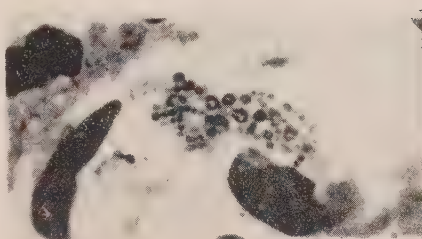


Fig. 12

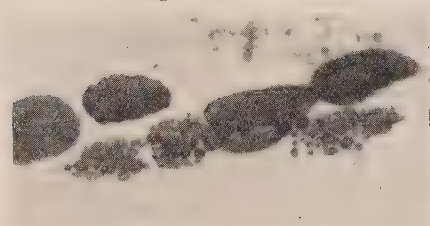


Fig. 13

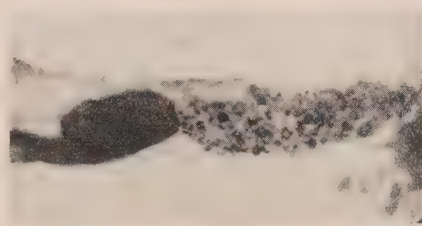


Fig. 14

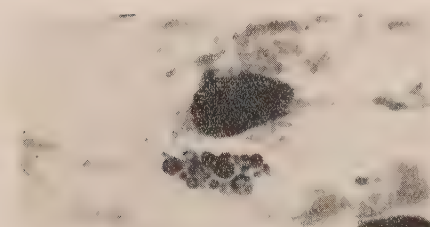


Fig. 15

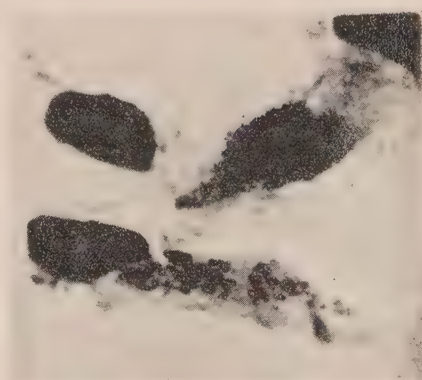


Fig. 16

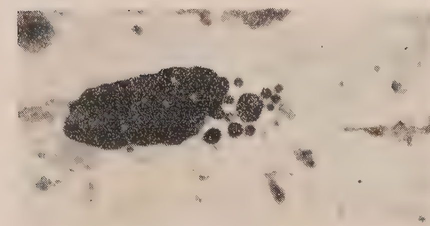


Fig. 17

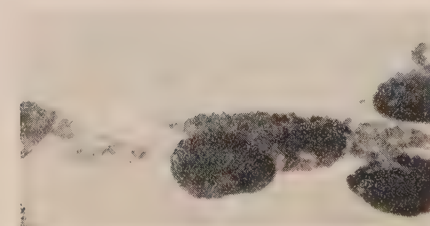


Fig. 18

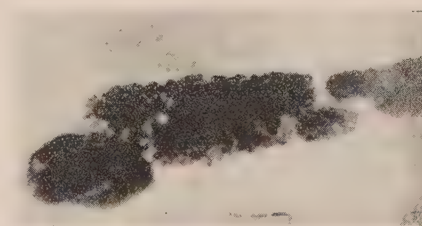


Fig. 19

facilmente riconoscibili. Infatti nelle colonie più sviluppate, costituite da un gran numero di elementi parassitari, le forme anulari sono molto piccole e, pur essendo largamente rappresentate rispetto alle altre categorie di elementi, si confondono facilmente con quelle coccoidi. Nelle colonie meno sviluppate invece le forme ad anello si apprezzano meglio sia perchè raggiungono dimensioni maggiori sia perchè sono mescolate a un numero limitato di elementi parassitari.

Dal punto di vista morfologico gli anelli possono essere completi o incompleti. Nel primo caso non presentano interruzioni lungo la parete e si colorano più o meno intensamente in rosa o in violetto; nel secondo caso presentano delle interruzioni, visibili specialmente a forte ingrandimento, che ne suddividono la parete in un numero variabile di segmenti bacillari arcuati (Fig. 25). Inoltre gli anelli del primo tipo possono risultare suddivisi in due parti, di forma semilunare, dalla presenza di un sepimento trasversale (Fig. 15). Quando l'interruzione è una sola, ciò che avviene con una certa frequenza, l'anello assume la forma di ferro di cavallo (Fig. 4).

In casi eccezionali si osservano anelli di notevoli dimensioni (micron 2-3,5 di diametro) che presentano internamente, a ridosso della parete, due o tre formazioni anulari a guisa di spore (Figg. 17-23).

Dall'esame dei preparati il parassita sembra essere formato da due sostanze distinte, l'una colorabile in bleu chiaro e identificabile con il citoplasma, l'altra tingibile in rosso o in violetto e riportabile alla cromatina nucleare. Per quanto riguarda quest'ultima, come si è già detto, la colorazione violetta domina in quasi tutti gli ammassi di parassiti mentre la rossa si osserva raramente a caratterizzare forme coccoidi o bacillari brevi di piccolissime dimensioni.

2) *Sede del parassita.* — La sede di *C. ruminantium* è il citoplasma delle cellule endoteliali; solo di rado gli ammassi parassitari si rinvengono nell'interno di nicchie o incavature formatesi sulla superficie del nucleo il cui aspetto morfologico viene pertanto modificato (Figg. 10-22). A questo proposito non è facile escludere in modo assoluto la esistenza di un parassitismo endonucleare da parte di *C. ruminantium;* accade infatti talvolta di osservare all'esame dei preparati la sovrapposizione alla massa nucleare di un numero più o meno abbondante di parassiti senza che sia possibile poi accertare se questi sono penetrati o meno nell'ambiente nucleare. La mancanza di alterazioni, apprezzabili microscopicamente, a carico del nucleo farebbe propendere per la esclusione di un tale parassitismo.

Per quanto riguarda l'aspetto assunto dalle rickettsie nell'interno delle cellule endoteliali, esso varia in rapporto alle diverse fasi con le quali si concretizza il parassitismo intracellulare. Questo comincia dal momento in cui uno o più elementi parassitari penetrano nella cellula endoteliale ponendosi

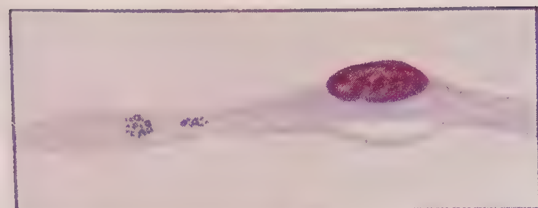


Fig. 20

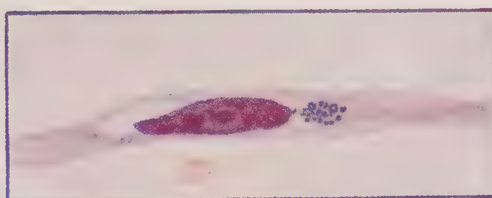


Fig. 21

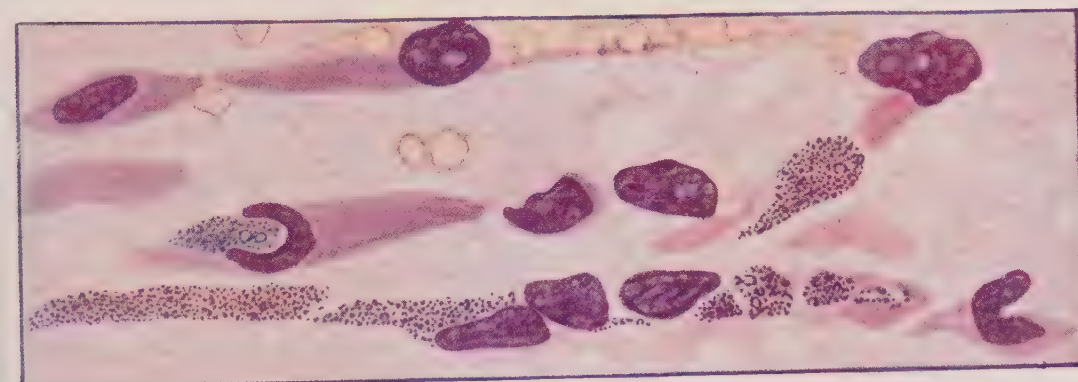


Fig. 22

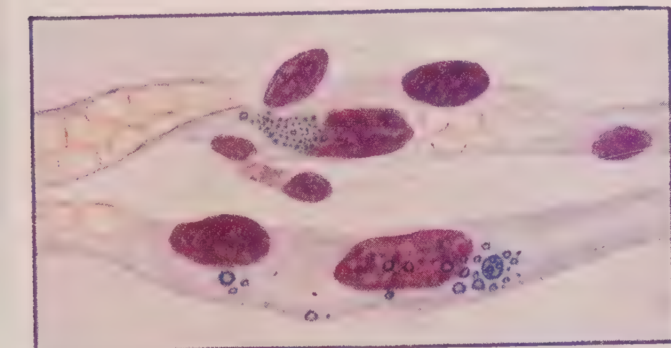


Fig. 23

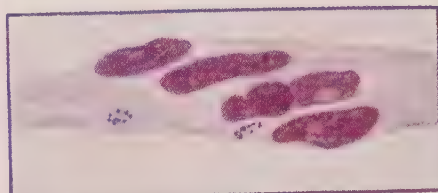


Fig. 24

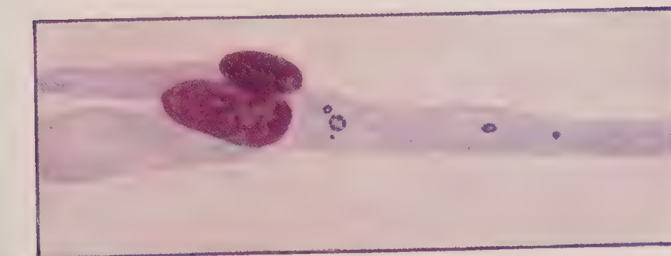


Fig. 25

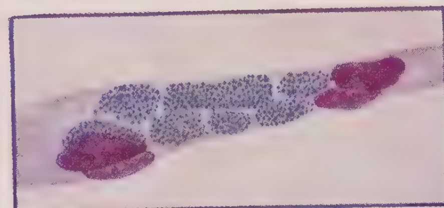


Fig. 26

Cowdria ruminantium Obb. imm. 105x - Oc. 6C. - Riproduzione con camera lucida - Figg. 20-21-24. In queste figure sono stati riprodotti alcuni aspetti, per lo più iniziali, del parassitismo da *C. ruminantium*. Le colonie sono costituite da rickettsie di forma coccoide mescolate, talora, a rari anelli. - Figg. 22-23-26. Raffigurazione di alcuni aspetti del parassitismo da *C. ruminantium* illustrati rispettivamente nelle figure 16-17-19. - Fig. 25. L'anello più grande è suddiviso in sei piccoli elementi batteroidi. Nella figura 22 si vede una estesa diffusione della rickettsia in cellule endoteliali contigue.

Grimaldi & Mercandetti - Roma

a distanza più o meno ravvicinata dal nucleo. In un secondo tempo, iniziando il parassita la sua moltiplicazione, si osservano delle piccole colonie costituite da pochi elementi (3-4-5-6) la cui morfologia può variare da una cellula all'altra. Infatti, mentre alcuni di questi piccoli ammassi sono costituiti da forme ad anello od ellissoidali altri sono formati da elementi coccoidi, granulari o bacillari brevi ed altri infine da parassiti appartenenti alle varie categorie morfologiche. Nella stessa cellula endoteliale vi è per lo più un unico ammasso di rickettsie, in qualche caso tuttavia ve ne sono due, tre o quattro.

Col progredire dei fenomeni riproduttivi il parassita forma delle colonie le cui dimensioni possono aumentare fino ai limiti della cellula invasa. Sorge ora il quesito se la riproduzione del parassita anzichè esaurirsi col raggiungimento di tali limiti, continua invece nel citoplasma delle cellule ancora indenni che si trovano nelle immediate vicinanze di quelle infette. A giudicare dalle dimensioni di alcuni ammassi, che si estendono per un lungo tratto nella parete del capillare (Figg. 8-11-19-22), l'ipotesi di una diffusione per contiguità di *C. ruminantium* sembra pienamente giustificata.

Per ciò che riguarda la morfologia delle rickettsie riscontrabili in questi ammassi assai sviluppati poco abbiamo da aggiungere dopo quanto è stato detto a proposito delle colonie in fase iniziale di sviluppo. In generale le dimensioni dei parassiti diminuiscono in ragione diretta del loro incremento numerico mentre la morfologia, se si eccettuano le colonie più evolute in cui le rickettsie assumono quasi sempre un aspetto coccoide, è abbastanza mutevole essendo caratterizzata da elementi coccoidi, a ferro di cavallo, bacillari brevi, clavati, a manubrio ecc. mescolati quasi sempre a un numero più o meno rilevante di forme anulari.

3) *Riproduzione del parassita.* — La lunga e accurata osservazione dei nostri preparati ha permesso di chiarire solo in parte questo importante problema. La presenza di forme a manubrio e bipolari parla in favore di una riproduzione per scissione semplice. Analogo meccanismo può essere invocato per interpretare la formazione sia degli anelli con sepimento trasversale sia di quelli la cui parete è suddivisa in un numero variabile di elementi bacillari ricurvi. Di dubbio significato invece sono le forme ad anello che presentano internamente, a ridosso della parete, elementi anulari di piccole dimensioni. Data l'eccezionalità di questo reperto si può pensare sia ad un aspetto degenerativo del parassita per il verificarsi di condizioni a lui sfavorevoli sia ad una forma di resistenza dello stesso con produzione di elementi di tipo endosporale.

La presenza di colonie a forma di morula (Figg. 16-19-22-26) giustifica anche l'ipotesi di una riproduzione schizogonica di questa rickettsia. Esaminando dette colonie si ha infatti l'impressione che gli elementi parassitari facciano parte di un'unica formazione che ricorda assai da vicino i *corpi plasmatici* di Koch riscontrabili nella theileriosi dei ruminanti. Tuttavia contro questa ipo-

tesi sta il mancato rilievo, nel ciclo evolutivo del nostro parassita, di elementi morfologici riportabili ai cosidetti «*Corpi iniziali*», a quelle formazioni cioè che sono sprovviste in un primo tempo di una apparente struttura interna e che successivamente si differenziano per dare origine a numerosi elementi batteroidi simili alle rickettsie.

In conclusione, pure non escludendo la possibilità di una riproduzione per scissione multipla (schizogonia), noi siamo propensi a credere che il parassita di cui ci stiamo occupando si riproduca per scissione semplice trasversale. In merito poi al significato da attribuire alle forme ad anello che contengono elementi di tipo sporale, riteniamo che ogni giudizio al riguardo sarebbe prematuro in vista di ulteriori indagini che ne chiariscano la posizione nel ciclo evolutivo del parassita.

Considerazioni e conclusioni

Le prime ricerche sulla morfologia di *C. ruminantium* risalgono al 1926 quando Cowdry (10-11) descrisse per la prima volta l'agente causale dell'idropericardite dei ruminanti. L'A. riporta il risultato di osservazioni compiute su preparati istologici allestiti con varî organi di animali infetti dove il parassita si presenta con una morfologia uniforme caratterizzata da elementi coccoidi di dimensioni variabili da micron 0,2 a micron 0,5. Cowdry accenna anche alla presenza di forme diplococciche alle quali attribuisce il significato di elementi in via di riproduzione binaria. Nelle zecche infette l'A. osserva un certo polimorfismo che si traduce con la presenza oltre che di forme cocciche e diplococciche, già rilevate nell'ospite vertebrato, anche di forme bacillari.

Alcuni anni più tardi Jackson e Neitz (22) riferiscono di avere osservato in animali infettati sperimentalmente con *C. ruminantium*, la presenza di parassiti conformati a cocco, ad anello, a ferro di cavallo e a virgola per i quali solo in rari casi si poteva presumere l'esistenza di una riproduzione per scissione semplice. Allo scopo di controllare l'ipotesi, già menzionata in precedenza, di una diffusione per contiguità di *C. ruminantium*, Jackson e Neitz (22) hanno compiuto delle ricerche consistenti nell'esame microscopico di preparati allestiti con le valvole giugulari di animali infetti. In questi preparati le rickettsie erano molto abbondanti, tuttavia gli AA. non si sono espressi in favore dell'ipotesi suddetta avendo constatato la presenza di cellule parassitarie in punti diversi e non contigui del campo microscopico, che lasciavano presumere un'origine multipla delle singole colonie di parassiti.

Dalle nostre osservazioni emerge subito una conferma alle ricerche di Purchase (28) secondo il quale l'esame microscopico degli strisci allestiti con sostanza cerebrale di animali infetti, costituisce un mezzo semplice e rapido per la dimostrazione di *C. ruminantium*. Inoltre, l'esame dei nostri preparati ha fornito nuovi ragguagli sulle caratteristiche morfologiche di questa ricket-

tsia permettendo il rilievo di forme parassitarie non ancora descritte prima di ora. Infatti, oltre quelle coccoidi, bacillari, ad anello e a ferro di cavallo già segnalate da Cowdry (10-11), da Jackson (21) e da Jackson e Neitz (22), abbiamo osservato forme anulari incomplete, forme anulari contenenti inclusioni di tipo sporale, forme bacillari a manubrio, bipolari, clavate e, infine, forme anulari suddivise da un sepimento trasversale.

Per quanto riguarda il significato da attribuire a queste forme abbiamo già avanzato alcune interpretazioni che possono così riassumersi: le forme anulari incomplete e quelle con sepimento trasversale sono da considerare come parassiti in via di riproduzione binaria. Le forme anulari contenenti inclusioni di tipo sporale rivestono un dubbio significato che può riguardare sia uno stato di sofferenza del parassita sia, al contrario, una manifestazione della sua accresciuta resistenza. Infine, le forme bacillari a manubrio, bipolari e clavate nonchè tutte quelle la cui morfologia ricorda i corinebatteri, si rinvengono con una certa frequenza nelle colonie in via di formazione, rispetto a quelle più evolute costituite da molti parassiti, e rappresentano non di rado aspetti riproduttivi della rickettsia.

Considerando ora nel complesso tutti gli aspetti morfologici di *C. ruminantium* e tenuto conto soprattutto della difficoltà di allineare le singole forme con le quali si presenta il parassita secondo un ordine progressivo di sviluppo, non ci sembra ancora giunto il momento di descrivere, o quanto meno di schematizzare, il ciclo evolutivo di questa rickettsia. Le ragioni sono state in parte già esposte. Da un lato si hanno fondati motivi per ammettere una divisione del parassita per scissione binaria semplice, dall'altro mancano invece elementi sicuri che consentano di escludere, specie nei riguardi di quelle colonie parassitarie di aspetto morulare riportabili a veri e propri schizonti, l'intervento di una riproduzione per schizogonia. Ovviamente se si pone come dimostrata l'esistenza della sola scissione trasversale semplice, il ciclo della rickettsia sarà sul tipo di quello descritto da Sikora (30) o prospettato da Babudieri (3) vale a dire assai prossimo a quello dei comuni schizomiceti, se viceversa si dimostra l'esistenza oltre della scissione semplice anche della schizogonia, allora l'accostamento sarà con i cicli più complessi descritti da Carpano (9), da Donatien e Lestoquard (15-16) e da Foley e Parrot (19).

Come abbiamo detto in precedenza, personalmente siamo più indotti ad escludere piuttosto che ad ammettere la schizogonia perchè nei preparati da noi esaminati, dove la rickettsia assume aspetti particolarmente chiari ed evidenti, non abbiamo mai riscontrato formazioni che possano riportarsi ai così detti « *Corpi iniziali* » così come sono stati descritti dai suddetti Autori. Per tale motivo non possiamo, almeno per ora, sottoscrivere l'affermazione di Donatien e Lestoquard (15) secondo la quale esiste una analogia fra il ciclo di sviluppo di *R. conjunctivae* e di *R. canis* con quello di *C. ruminantium*.

Da quanto sopra è stato riportato ci sembra infine che l'iniziativa di

Bengston di separare le varie rickettsie dell'uomo e degli animali da quella dell'idropericardite dei ruminanti, sia pienamente giustificata. Infatti, come risulta dal manuale del Bergey, che tale iniziativa ha fatto propria, la differenza fra i varî generi della famiglia *Rickettsiaceae* è di natura prettamente morfologica basandosi sull'aspetto «*baciliare, ellissoidale* e *coccoide*» delle rickettsie propriamente dette e delle coxielle e sulla forma «*sferica e occasionalmente allungata*» delle cowdrie.

RIASSUNTO

Gli AA. studiano la morfologia di *Cowdria ruminantium* nel sistema nervoso centrale di pecore venute a morte per idropericardite infettiva. Applicano, a tal fine, una tecnica analoga a quella usata nel Kenia da Purchase consistente nell'allestire degli strisci con frammenti di corteccia cerebrale che, dopo il rene, costituisce la sede più ricca di parassiti, e nel colorarli con il metodo di Donatien e Lestoquard.

Dall'insieme delle osservazioni fatte gli AA. giungono alle seguenti conclusioni:

1) - a somiglianza di tutte le altre specie di rickettsia, *Cowdria ruminantium* presenta uno spiccato polimorfismo nel quale tuttavia prevalgono le forme anulari complete o incomplete;

2) - in casi eccezionali il parassita appare sotto forma di grandi anelli che presentano internamente, a ridosso della parete, due o tre formazioni anulari a guisa di spore.

3) - l'ipotesi di una diffusione della rickettsia per contiguità lungo la parete del capillare è giustificata dall'aspetto assunto da alcuni ammassi parassitari i quali si estendono oltre i limiti territorali delle singole cellule invase;

4) - la presenza di forme a manubrio e bipolari, di anelli con sepimento trasversale e di anelli con parete suddivisa in un numero variabile di elementi bacillari ricurvi, induce ad ammettere una riproduzione del parassita per scissione semplice. Rimane dubbia la schizogonia dello stesso per l'assenza di formazioni riportabili ai cosidetti «*Corpi iniziali*»;

5) - è ancora prematuro avanzare uno schema del ciclo evolutivo della rickettsia risultando estremamente difficile differenziare gli elementi che ne caratterizzano le fasi iniziali da quelli appartenenti agli stadi più avanzati.

SUMMARY

The morphology of *Cowdria ruminantium* in the central nervous system of sheep died for heart-water infection is studied. The method used by Purchase in Kenya has been applied in the preparation of smears.

From all the observations made, the following conclusions can be drawn:

1) - *Cowdria ruminantium*, as it appear in all the other rickettsial species, exibits a distinct polymorphism in which however, annular forms, complete or incomplete, prevail;

2) - the parasite, in exceptional cases, may appear under the form of large rings which, internally and close to the wall, show two or three annular formations like spores;

3) - the diffusion of *Cowdria ruminantium* along the capillary walls may occur by contiguity since masses of parasites can be found beyond the territorial limits of infected cells;

4) - the reproduction of *Cowdria ruminantium* may occur by simple fission, since the parasite may appear under bipolar forms or under the form of dumb-bells, or of rings with trasversal septa, or of rings in which the walls appear divided by curved bacillary elements. The reproduction by schizogony appears to be doubtful, since the so-called « *initial bodies* » cannot be recognised with certainty in the smears;

5) - the developmental cycle of *Cowdria ruminantium* is still not discernible for the difficulty to distinguish elements of the initial phases from those of the advanced stages.

BIBLIOGRAFIA

1) Babudieri, B. (1943): *Rend. Ist. Sup. San.*, *6*, 292.
2) Babudieri, B. e Bocciarelli, D. (1943): *Rend. Ist. Sup. San.*, *6*, 298.
3) Babudieri, B. (1944): *Rend. Ist. Sup. San.* 7, 570.
4) Bengston, J. A. (1947): *J. Bact.*, *53*, 325.
5) Breed, S. R., Murray, E. G. D. e Hitchens, A. P. (1948): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ballière, Tindall & Cox, London, 1083.
6) Brumpt, E. (1949): Précis de parasitologie. Collection de Précis Medicaux, Masson & Cie., 537.
7) Carpano, M. (1935): *Ann. Paras. hum. et Comp. 3*, 238.
8) Carpano, M. (1936): *Profilassi 9*, 2.
9) Carpano, M. (1939): *Riv. di Parass.*, *3*, 293.
10) Cowdry, E. V. (1926): 11*th. and* 12*th. reports of Dir. Vet. Educ. and Res. U. of S. A.*, B, 161.
11) Cowdry, E. V. (1926): 11*th. and* 12*th. reports of Dir. Vet. Educ. and Rers. U. of. S. A.*, C, 88.
12) Curasson, G. (1943): Traité de protozoologie Vétérinaire et comparée *3*, 355.
13) Da Rocha Lima, H. (1916): *Berl. Klin. Woch.*, *53*, 567.
14) Donatien, A. e Lestoquard, F. (1937): *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, *15*, 142.
15) Donatien, A. e Lestoquard, F. (1938): *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie 16*, 451.
16) Donatien, A. e Lestoquard, F. (1940): *Arch. Inst. Pasteur d'Algéric 18*, 203.
17) Eigelsbach, H. T., Chambers, L. A. e Coriell, L. (1946): *J. Bact. 52*, 179.
18) Eyer, A. e Ruska, H. (1944): *Zeitsch. Hygiene*, *125*, 483.
19) Foley, H. e Parrot, L. (1938): *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie 16*, 283.
20) Giroud, P. e Panthier, R. (1942): *Bull. Soc. Path. exot.*, *35*, 6.
21) Jackson, C. (1931): 12*th. Report Dir. Vet. Serv. and Anim. Ind. U. of S. A.* 161.
22) Jackson, C. e Neitz, O., (1932): 18*th. Report of Dir. Vet. Serv. and Anim. Ind.*, *U. of S. A.*, 49.
23) Levaditi, C. e Levaditi, J. C. (1938): in Levaditi, C. e Lépine, P., Les ultravirus des Maladies Humaines, Ed. Maloine, Paris, 2ª ed.
24) Levaditi, C. (1949): Images électroniques en microbiologie, Ed. Maloine, Paris.
25) Mariani, G. (1951): in Carlinfanti, E. e Magrassi, F., Trattato di Malattie Infettive, Ed. Scient. It., Napoli 1951, *1*, 1005.
26) Neveu - Lemaire, M. (1943): Traité de Protozoologie Médicale et Vétérinaire, Paris, Vigot fr. Ed. 658.
27) Plotz, H., Smadel, J. E., Anderson, T. F. e Chambers, L. A. (1943): *J. exp. Med.* 77, 355.
28) Purchase, H. S. (1945): *The Veterinary Record*, *57*, 413.
29) Shepard C. C. e Myckoff R. W. G. (1946): *Publ. Health Rep.*, *61*, 761.

30) SIKORA, H. (1942): *Z. Hyg. 124*, 250.
31) STUART - HARRIS, C. H. (1950) in BEDSON, S. P. DOWNIE, A. W., MACCALLUM, F. O. e STUART - HARRIS, C. H., Virus and rickettsial disease, Edward Arnold & C°, London, 1950, 62.
32) TOPPING, N. H. (1948): Diagnostic Procedure for virus and rickettsial diseases, American Public Health Association, N. Y. City, 300.
33) VAN ROOYEN, C. E. e SCOTT, G. D. (1949): *Canad. J. of Res.*, 27, 250.
34) WEISS, CH (1943): *J. Immunol.*, *47*, 353.
35) WOLBACH, B. S. (1919): *J. Med. Research*, *41*, 87.
36) WOLBACH, B. S. e TODD, J. L. (1920): *Ann. Inst. Pasteur*, *34*, 158
37) WOLBACH, B. S., TODD, J. L. e PALFREY, F. W. (1922): The Etiology and Pathology of Typhus, Harward University Press.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

UN FOCOLAIO DI *KALA AZAR* SUL MONTE ARGENTARIO (COSTA TIRRENICA TOSCANA)

AUGUSTO CORRADETTI e ITALIA NERI (*) (**)

In questa nota si comunicano i risultati di alcune indagini relative alla zona di kala azar del Monte Argentario già segnalata da uno di noi al Primo Simposio Internazionale sulla lotta contro gli insetti vettori di malattie trasmissibili (1).

Il Monte Argentario è situato sulla Costa Tirrenica Toscana, presso la città di Orbetello. Esso era anticamente un'isola, ma successivamente due strette lingue di terra l'hanno unito alla terraferma, con la formazione di una laguna di 26 Km^2, che ha preso il nome di Stagno d'Orbetello. Il Monte Argentario ha forma ellittica e, pur essendo alto 635 m., appare, per il suo isolamento, una montagna notevole. Il suo perimetro è di circa 39 Km., con l'asse maggiore di Km. 11,5 e il minore di Km. 7. Il Monte per più di 3/4 della circonferenza cade a picco sul mare e ha tutt'intorno promontori e isolotti. Vi sono selve, macchie, piantagioni di agrumi, di ulivi, di alberi da frutto e vigne. Il suo centro principale è Porto Santo Stefano (circa 8.000 abitanti), situato sulla costa Nord: centro minore è Porto Ercole posto sulla costa sud-est.

I casi di leishmaniosi viscerale che si sono rilevati nella zona tra il 1943 e il 1952 sono stati una ventina e tutti in bambini nei primi anni di vita. La totalità dei casi si è verificata a Porto Santo Stefano, e particolarmente nelle strade periferiche della cittadina, che erano a più immediato contatto con la campagna. I casi sono stati accertati nell'Ospedale di Orbetello e nella Clinica Pediatrica dell'Università di Roma diretta dal prof. FRONTALI: lo studio clinico di 15 casi è stato compiuto dai dott. SEGANTI e PALOMBELLI, allievi del prof. FRONTALI, che ne faranno oggetto di una loro pubblicazione. In 14 di

---

(*) *Istituto Superiore di Sanità.*

(**) Gli AA. ringraziano per le facilitazioni ricevute il dr. SAMMARTINO, medico provinciale di Grosseto.

questi casi, la diagnosi è stata determinata con il reperto microscopico di leishmanie nel puntato midollare.

Le nostre ricerche, a cui ha validamente collaborato il capo-tecnico FRANCESCO NERI, sono state dirette allo studio dei flebotomi non solo della località endemica (Porto Santo Stefano), ma di varie zone del Monte Argentario.

Le catture di flebotomi sono state eseguite durante le stagioni estive degli anni 1953 e 1954. Il crescente uso degli insetticidi ha reso molto difficoltose le ricerche sui flebotomi, e praticamente ha impedito anche in questa zona, come del resto quasi ovunque in Italia, l'utile confronto tra i reperti di flebotomi



Zona del Monte Argentario.

nelle case e quelli nelle stalle. A causa degli insetticidi distribuiti i flebotomi nelle case non si sono potuti rinvenire, e pertanto i dati che riferiamo sono tutti dedotti da esemplari catturati in stalle di equini e di bovini. Per i dati relativi a Porto Santo Stefano, le catture sono state eseguite in stalle adiacenti ad abitazioni in cui si erano verificati casi di leishmaniosi.

I risultati sono esposti nella tabella. Da essa si rileva che su 1.554 flebotomi catturati nelle diverse località e in tempi diversi delle due stagioni estive sopra dette, 1.547 appartengono alla specie *Ph. perniciosus* che è la specie che che si riscontra nelle zone classiche di leishmaniosi interna in Italia. In percentuale minima erano pure presenti il *Ph. papatasi* e il *Ph. minutus*.

TABELLA 1

Risultati delle catture di flebotomi in diverse località del Monte Argentario

Località	Data	*Ph. perniciosus*		*Ph. papatasi*		*Ph. minutus*	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Porto Santo Stefano	25/8/53	23	57	—	—	—	—
Porto Santo Stefano	15/9/53	73	67	—	—	—	—
Porto Santo Stefano	21/6/54	74	270	1	—	1	—
Porto Ercole	16/9/53	9	51	1	2	—	—
Porto Ercole	22-30/6/54	114	222	—	—	—	—
Valle Terra Rossa (Strada per P. Ercole - Convento) . . .	25/8/53	7	6	—	—	—	—
Valle Terra Rossa (Strada per P Ercole - Convento) . . .	16/9/53	4	6	—	—	—	—
Località Campani	22-29/6/54	102	462	2	—	—	—
		406	1.141	4	2	1	—

Totale per l'intera zona:

Ph. perniciosus	1.547
Ph. papatasi	6
Ph. minutus	1

La presenza del *Ph. perniciosus* in popolazione quasi pura fa del Monte Argentario una zona tipica di leishmaniosi interna, come la zona del Vesuvio e quella dell'Etna. Da un punto di vista epidemiologico è importante notare l'apparente assoluta assenza del *Ph. perfiliewi*, che è viceversa presente sulla terra ferma della Costa Tirrenica (come esporremo in un prossimo lavoro), e l'assenza di casi di leishmaniosi cutanea.

RIASSUNTO

A Porto Santo Stefano sul Monte Argentario (Costa Tirrenica Toscana) si sono verificati circa 20 casi di Kala azar infantile negli anni tra il 1943 e il 1952. Le catture di 1.554 flebotomi eseguite in varie località del Monte Argentario in diversi tempi degli anni 1953 e 1954 hanno dato i risultati seguenti: *Ph. perniciosus* 1.547, *Ph. papatasi* 6, e *Ph. minutus* 1. Il Monte Argentario va quindi considerato come una zona tipica di kala azar infantile, come le falde del Vesuvio e quelle dell'Etna.

SUMMARY

At Porto Santo Stefano (Monte Argentario Tyrrhenian Coast of Tuscany) about 20 cases of infant kala azar occurred between 1943 and 1952. Phlebotomus catches made in different localities of the Monte Argentario during the years 1953 and 1954 gave the following results: out of 1.554 phlebotomus captured, 1.547 were *Ph. perniciosus*, 6 *Ph. papatasi* and 1 *Ph. minutus*. Therefore Monte Argentario appears to be a typical zone of infant kala azar as well as the Vesuvius and Etna zones.

BIBLIOGRAFIA

1. CORRADETTI A. (1953): The control of Leishmaniasis through *Phlebotomus* control in Italy. First International Symposium of the control of insects vectors of diseases. Roma, Istituto Superiore di Sanità, October 1953, p. 57-67.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

DETERMINATION OF THE AGE OF THE HOUSEFLY *MUSCA DOMESTICA VICINA* MACQ. BY THE PERSISTANCE OF LARVAL FAT BODY CELLS IN THE IMAGO.

R. CWILICH (*) and G. G. MER (*)

In the progress report from this station presented by the senior author to the « Simposio Internazionale sulla lotta contro gli insetti vettori di malattie trasmissibili. Rome, 1953 » a suggestion was made that the presence of larval fat body cells in the coelom of adult flies for some days after their emergence from pupa may serve to determine the age of these flies. Numerous larval fat body cells were found in the flies on the first day after emergence, the cells gradually disintegrated during the following days and none were found on the fourth day of the imago life.

Further observations on the behaviour of the larval fat body cells in the adult fly are now reported.

The number of fat body cells was counted and the size of these cells measured in flies of both sexes during first four days after emergence. The flies dissected during the first 3 days were given only water and those dissected on the 4 day were from the beginning supplied with sugar and dried milk. All flies were kept at 25-26° C. and approx. 65% R. H. The fifth and following abdominal segments containing the most larval fat body cells were separated from the rest of the abdomen with sharp angular iridectomy scissors and teased apart in a drop of saline. The floating larval fat body cells were counted under the dissection microscope and their diameter measured with an ocular micrometer.

Results of these dissections are summarized in tables I and II.

Discussion.

Large numbers of larval fat body cells were found to remain in the coelom of adult flies for the first few days after their emergence from pupa. The

(*) *The Malaria Research Station of the Hebrew University. Rosh-Pina. Israel.*

TABLE I.

Number of fat body cells from every individual fly taken at tandom

Age of Flies Days	Sex.	No. dissected.	of these contained:			
			less than 100 celles	100-300	300-500	more than 500
1.	M.	40	0	27	13	0
	F.	40	0	8	29	3
2.	M.	40	3	28	9	0
	F.	40	0	17	23	0
3.	M.	40	15	25	0	0
	F.	40	4	32	4	0
4.	M.	100	23	0	0	0

N. B. -- None of the 23 male flies showing larval fat body cells on the 4th day had more than 10 cells. In the remaining 77 flies no cells were found.

TABLE II.

Measurements of the diameter of the larval fat body cells as carried out on 40 to 80 cells from every individual fly taken at random.

Age of flies. Days.	Sex.	No. flies dissected	Mean diameter of the larval dissected fat body cells in Microns	S. D. ±
1.	M.	21	110	20
	F.	23	120	25
2.	M.	19	90	20
	F.	21	95	25
3.	M.	21	80	20
	F.	33	70	20

number of these cells as well as their size are reduced with the ageing of the fly. Pratically no such cells are found in the coelom of male flies 4 days old if these are kept at a temperature of 25 to 27° C. Because of the considerable range of individual variations it is impossible to determine the exact age of an individual fly from the number of larval fat body cells or their average size, but it is evident that all flies containing such cells have only recently emerged and, generally, the younger the fly the larger the number of fat body cells in the coelom. It is suggested that by the simple procedure of dissecting flies for larval fat body cells it is possible to establish the presence and percentage of newly emerged individuals in the population. The presence of such individuals would evidently signify a source of active breeding and abolition of such sources would cause disappearance of the newly emerged flies or reduce the percentage of such in the fly population. On the other hand destruction of adult flies only, would show itself primarily in an increase of the percentage of newly emerged flies. This procedure would also enable the study of behaviour of flies during the first few days after their emergence.

SUMMARY

In continuation of praeliminary studies already reported (loc. cit.), flies, both fed and unfed, were dissected on different days after their emergence from pupa. The number and size of larval fat body cells in the coelom was noted and it was found that these decreased with age, only very few being present at the 4th day and none thereafter. It is suggested that this procedure may be of assistance in studying the age composition of fly populations, in the study of fly behaviour and in checking the results of various types of antifly campaign.

RIASSUNTO

Continuando gli studi preliminari già riportati (loc. cit.) l'Autore ha eseguito dissezioni di mosche, nutrite e digiune, dopo periodi diversi dal loro sfarfallamento. E' stato notato il numero e le dimensioni delle cellule dei corpi grassi larvali nel celoma ed è stato osservato che tali cellule diminuivano di numero con l'età, e che solo poche di esse erano presenti al quarto giorno, e nessuna dopo di questo.

L'Autore ritiene che questo procedimento possa essere di aiuto nella determinazione dell'età degli individui componenti una popolazione di mosche, nello studio del comportamento delle mosche e nel controllo dei risultati di tipi diversi di campagne anti - mosche.

BIBLIOGRAPHY

G. G. Mer (1953): Observations on the behaviour and control of houseflies in a rural area in Israel. Progress report of studies presented to the Simposio Internazionale sulla lotta contro gli insetti vettori di malattie trasmissibili. Rome 1953.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

STUDIO DI UN *HABITAT* MONTANO DELL'*A. LABRANCHIAE* IN SICILIA (*)

GIUSEPPE D'ALESSANDRO (**)

Dall'inizio dello scorso anno abbiamo in corso ricerche sull'anofelismo in Sicilia, con l'obbiettivo di indagare sulla situazione esistente dopo sei anni di estesa applicazione del DDT e di altri insetticidi; azione che ha portato, come in altre regioni d'Italia, alla scomparsa pressochè totale della malaria I risultati delle indagini sono stati consegnati in una memoria in corso di pubblicazione (D'Alessandro e Coll., 1954).

Per ciò che si riferisce all'anofelismo è stato chiaramente messo in evidenza che tutta l'Isola è abitata dalle tre specie: *A.* (*Maculipennia*) *labranchiae* Fni., *A.* (*Anopheles*) *claviger* Meig., *Myzomyia* (*Neocellia*) *superpictus* Grassi. Per intensità numerica e per frequenza di focolai larvali le specie si allineano nel seguente ordine: 1° *labranchiae*, 2° *claviger*, 3° *superpictus*.

Del tutto recentemente Cefalù e Terminello (1954) hanno segnalato l'esistenza in Sicilia di focolai localizzati di *A.* (*Missirolimyia*) *algeriensis* Theo.

L'attuale situazione è caratterizzata dalla ancora frequente positività della massima parte dei corsi d'acqua che si prestano alla vita larvale. Il confronto con focolai positivi in epoca ante-DDT dimostra che la differenza col passato è sopratutto di ordine quantitativo. Un solo fatto, di importanza capitale, caratterizza lo stato odierno dell'anofelismo nell'Isola: la scomparsa di adulti da case, capanne ed altri ricoveri costruiti dall'uomo e ciò ovviamente in conseguenza dell'azione dell'insetticida.

Le ricerche alle quali si è brevemente accennato sono valse anche ad ap-

(*) Le presenti ricerche fanno parte di un programma di studi eseguiti sotto gli auspici e con il contributo dell'Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità. Ad esse hanno preso parte: Cefalù M., D'Alessandro G., Lazzara A., Mariani M., dell'Istituto d'Igiene dell'Università di Palermo; Cracolici M., Malariologo della Direzione Regionale di Sanità; Trifilò A., Malariologo dell'Ufficio Provinciale di sanità di Messina; Monastra S., Direttore Stazione Antimalarica di Capodorlando; Maltese V., infermiere addetto alle ricerche.

(**) *Istituto d'Igiene e Microbiologia dell'Università di Palermo.*

profondire alcuni aspetti della vita dell'*A. labranchiae* in Sicilia (CEFALÙ, 1954; D'ALESSANDRO e Coll., 1954; MARIANI e CEFALÙ, 1954). E' stato, infatti, constatato con ogni evidenza che in alcune zone della Sicilia l'*A. labranchiae* trascorre una vita extra-domestica, caratterizzata dalla presenza, *in tutti i mesi dell'anno,* di adulti di *A. labranchiae* in ricoveri naturali di varia grandezza e natura (grotte, crepe di rocce, cunicoli e tane di piccoli mammiferi, ecc.). E' escluso che questo fenomeno possa addebitarsi a superpopolazione e lo dimostra il fatto che la ricerca accurata nelle poche case esistenti nel perimetro delle zone da noi esplorate sono risultate disabitate da Anofeli.

* * *

Lo studio della vita extra-domestica del principale vettore siciliano ci è sembrato meritevole di interesse sotto diversi aspetti, ed è per tale considera-



Grafico 1 - Topografia della zona del lago Bivieri e del M. Sori

zione che abbiamo esteso le ricerche ad altre zone dell'Isola con risultati che hanno confermato le nostre prime osservazioni.

Recentemente nel piano di dette indagini abbiamo compiuto l'esplorazione di una località montana, boschiva, con scarsa popolazione umana, zona che da una vecchia segnalazione di uno di noi (Mariani, 1929), confermata lo scorso anno, ci risultava abitata dall'*A. labranchiae*.

Ci è sembrato opportuno indirizzarci verso un'area montana, con scarsa influenza umana, al fine di approfondire in più opportune condizioni lo studio della vita extra-domestica della specie.



Fig. 1 - Lago Bivieri. Visione parziale della riva sud.

La zona prescelta fu M. Sori (m. 1874), la più alta cima dei Monti Nebrodi, e le sue pendici, fino alla quota 1278, là dove si adagia un laghetto denominato Bivieri di M. Sori (Grafico I).

Il nostro soggiorno in detta zona si svolse dal 9 al 14 agosto 1954. Nell'unico fabbricato esistente, in prossimità del laghetto, venne approntato un piccolo laboratorio per l'esame immediato del materiale raccolto, ma la maggior parte di esso venne conservato e studiato successivamente a Palermo.

Il tempo si mantenne buono con cielo quasi sempre sereno; soltanto nel primo giorno spirò un forte vento di scirocco. Le temperature massime e minime in località Bivieri furono rispettivamente 25° e 14° C.

Iniziando la salita al Km 33 dello stradale che da S. Fratello conduce a Randazzo ci si inoltra in un fitto bosco di Faggi (*Fagus sylvatica*), per una mulattiera che lo percorre per oltre 10 Km, raggiungendo una radura depressa

che fa da letto ad un grande pantano (Lago Bivieri), a forma di triangolo scaleno, che si estende in lunghezza per poco più di un Km, con una larghezza massima di circa 350 metri e superficie di circa 375.000 mq. Quattro o cinque isolotti sommersi ed affioranti sono coperti di fitta vegetazione di *Scirpus lacustris* L. (Giunco maggiore di lago) (fig. 1 e 2). Una gran parte della superficie delle acque è coperta dalle foglie coriacee di un *Potamogèton* (fig. 3); nelle



Fig. 2 - Lago Bivieri. Isolotti coperti di *Scirpus lacustris*.

parti sgombre da questa pianta, poco sotto il livello dell'acqua, si svela una fitta vegetazione di una pianta sub-acquea (*Myriophyllum spicatum* L.). Nel centro del lago, per un diametro di circa 10 metri l'acqua è sgombra di vegetazione ed è visibile il movimento della polla che alimenta il laghetto.

Già da molti anni è stata introdotta nelle acque la Gambusia (*Gambusia hoolbrooki*) che vi prospera largamente, quivi trovando un *pabulum* molto ricco, costituito da larve di *Agrionidae* e di numerose altre specie di insetti Sulle rive del laghetto, fra gli abbondanti piccoli cespugli di *Mentha pule-*



Fig. 3 - Particolare della superficie del lago Bivieri mostrante la vegetazione di *Potamogèton*.

gium L., e dai numerosi *Cirsium italicum* D. C., *Rubus tomentosus* Bork. e *Rosa alpina* L., che costituiscono la flora terrestre predominante della zona lambita dalle acque, volano a migliaia gli adulti del Lepidottero-Piralididae: *Nymphula nymphaeata* Don. le cui larve sono minatrici delle foglie del *Potamogèton* che ricoprono la superficie delle acque. La riva Nord-Est è delimitata da un colle coperto di vegetazione bassa, mentre la riva Sud-Ovest sale, dapprima con pendio dolce e poi rapidamente, verso il fianco del monte ricoperto di Faggi, di frequenti cespugli di *Ilex aquifolium*, rari *Quercus cerris* ed *Acer campestre*. Nella zona scoperta, fra il bosco e la riva del lago, prospera la Felce: *Athyrium filix-foemina* Roth. e sorge il fabbricato che ci servì da abitazione e laboratorio. Sulla riva meridionale del lago, Faggi secolari vivono fino a circa tre metri dalla sponda con un dislivello delle radici di due metri dal pelo dell'acqua. (fig. 4).

La grande radura ora descritta è interamente circondata da boschi posti su terreno accidentato, solcato da piccoli corsi d'acqua incassati fra le rocce,

in ripido pendio. In direzione Ovest in piccole radure si incontrano numerosi pantani alimentati da ruscelli o da polle.

Sempre salendo attraverso il bosco, verso M. Sori, si incontrano numerosi corsi d'acqua e ristagni il più alto dei quali è a m. 1810. L'acqua di questo



Fig. 4 - Il lago Bivieri visto da un vecchio faggio che ospitava nelle sue cavità adulti di *A. labranchiae*.

ristagno alimentato da una vicina polla aveva una temperatura di 14° C. e la sua superficie era ricoperta in gran parte da uno strato di *Lemna polyrrhiza* L.; sul terreno lambito dall'acqua cresceva la *Montia fontana* L.

La fauna locale di Vertebrati a sangue caldo era costituita da poche specie di uccelli fra le quali, più frequenti, il Merlo, la Gazza e la Cornacchia e da piccoli mammiferi: Lepre, Ghiro, varie specie di Ratti e Topi e qualche rara Volpe. Il Ghiro è, fra i Mammiferi, l'abitatore più frequente del bosco. A questi abitatori selvatici si aggiungono, durante la stagione estiva, greggi di

Pecore e branchi di Porci. I Bovini sono rari e gli Equini sono rappresentati da qualche branco di Cavalli viventi allo stato brado e dai pochi Muli che servono quale mezzo di trasporto ai coloni dalla fattoria.

Dal punto di vista pedologico la zona è al punto di contatto fra i terreni su arenarie e sabbie plioceniche ed i terreni su argille e marne terziarie, con predominanza dei primi.

* * *

La nostra prima constatazione riguarda il laghetto. *Esso si rivelò un immenso focolaio puro di A. labranchiae.* Come si è accennato, la superficie dell'acqua era quasi completamente coperta da una fitta vegetazione di *Potamogèton*. Allontanandosi dalla riva a mezzo di una piccola imbarcazione, si poterono pescare fra le foglie del *Potamogèton* numerosissime larve di *A. la-*



Fig. 5 - Il letto di un ruscello montano con focolai larvali e ricoveri di adulti.

branchiae; le pescate furono invece molto meno fruttuose sulle sponde del lago. E' probabile che la maggior ricchezza di larve riscontrata nelle parti meno prossime alla riva dipenda dal fatto che le foglie di *Potamogèton* offrono alle femmine condizioni ideali per la sosta necessaria all'ovodeposizione. E' anche verosimile che quivi le larve siano meno esposte agli attacchi di specie pre-



Fig. 6 - Una capanna da carbonai in radura del bosco (q. 1630).

datrici. Indugiando sulla riva nelle ore pre-crepuscolari alcuni di noi furono aggrediti da sciami di femmine di *A. labranchiae* che furono in gran parte catturate ed identificate.

Il giorno successivo vennero esplorati i dintorni del lago dirigendo in particolare la nostra attenzione alle cavità di vecchi tronchi e radici di Faggi,

parzialmente protette da cespugli. In alcuni di tali recessi furono catturati maschi e femmine di *labranchiae.*

Al lago Bivieri affluiscono alcuni ruscelli e ne seguimmo il corso verso monte. Venne constatato che tra i massi che ingombrano i letti e la vegetazione delle sponde esistevano ricoveri capillari del *labranchiae.* La ricerca di larve nelle acque che, come quelle del Bivieri, sono contrassegnate da modesto grado di salinità (0,026 $^0/_{00}$), diede esito positivo per *A. labranchiae.*

Percorrendo la zona circostante il lago e allontanandoci da esso per circa un chilometro vennero esaminati alcuni ristagni e polle d'acqua in cui insieme a quelle di *labranchiae,* furono catturate larve di *A. claviger.*

Un piccolo corso d'acqua in forte pendio, interrotto da gradinate e profondamente incassato fra le rocce, venne parimente esplorato, ed anche qui non mancò la presenza di numerose larve di *A. labranchiae* che vivevano in conche formate dalle depressioni dei gradini (fig. 5). Dopo questo reperto, ritornammo nella detta località sull'imbrunire e ci allontanammo di alcune centinaia di metri dal corso d'acqua, in zona deserta di abitazioni o comunque di ricoveri costruiti dall'uomo, zona attraverso la quale avviene solo il transito di greggi e di pochi pastori. Sulle gambe nude di alcuni di noi si affollarono numerose femmine di *A. labranchiae* alcune delle quali riuscirono a pungere nonostante la nostra attenzione e la rapida cattura.



Fig. 7 - Ristagno d'acqua ricoperto parzialmente di *Lemna.* Focolaio larvale di *A. labranchiae* a quota 1810.

L'ultimo giorno venne dedicato alla visita della cima del M. Sori e delle sue immediate adiacenze. Sul cammino, a quota 1630, ci imbattemmo in un rudimentale villaggetto di carbonai con tipiche abitazioni costituite da capanne di paglia ricoperte di argilla (fig. 6). Nelle prossimità erano alcune polle d'acqua anch'esse popolate da larve di *A. labranchiae*. La cima del monte si rivelò arida ma ridiscendendo sul pendio Nord-Ovest, a quota 1810 circa, si presentò alla nostra vista un ristagno d'acqua alimentato da una polla e in gran parte ricoperto di *Lemna polyrrhiza,* intensamente popolato da larve di *A. labranchiae* (fig. 7). La ricerca di adulti nella detta zona, diretta specialmente all'esame dei ricoveri possibilmente offerti dalla vegetazione di Faggi fu negativa.

Le abitazioni presenti nella zona studiata, oltre le capanne d'argilla già ricordate, erano costituite dal fabbricato della fattoria del Bivieri che era stato recentemente trattato con DDT e da una capanna di paglia. Solo in quest'ultima furono trovati alcuni adulti di *labranchiae*.

Il materiale raccolto durante il soggiorno nella zona venne ulteriormente esaminato a Palermo senza che per altro fossero risultati elementi, relativi alla classificazione delle specie, diversi da quelli forniti dalle osservazioni fatte sul luogo.

* * *

Lo studio di M. Sori e delle sue immediate adiacenze ci ha messo dunque in presenza di un *habitat* montano dell'*Anopheles labranchiae* scarsamente influenzato dall'uomo. Infatti la popolazione umana residente in tale località è attualmente costituita da pochi coloni che vi sostano parte dell'anno, da alcuni pastori con i loro greggi e dai carbonai che tagliano il bosco spostandosi secondo il ciclo prescritto.

Le pendici del monte sono attraversate da una mulattiera con scarso transito e, come è stato rilevato, esiste un solo fabbricato in tutta la zona oltre alle capanne temporaneamente abitate dai carbonai. La zona descritta, a parte la presenza di piccoli focolai di *claviger,* posti alla periferia, verso valle, è intensamente abitata da una popolazione pura di *A. labranchiae*. A nostra conoscenza questo rappresenta l'*habitat* montano più alto finora segnalato per la specie (da m. 1234 a m. 1810); ma a parte questo rilievo, ciò che si desidera sottolineare è il fatto che in tale zona il *labranchiae* trascorre essenzialmente una vita extra-domestica. E' infatti da escludere che la poca influenza umana che si ravvisa nella zona possa essenzialmente contribuire a realizzare condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo della specie. E del resto le osservazioni ora riferite non fanno che confermare quella più vecchia di uno di noi (Mariani 1929) fatta in un'epoca in cui le condizioni del luogo erano ancor meno influenzate dall'uomo e la zona più fittamente coperta di boschi non sfruttati. E' chiaro però che la presenza di greggi soprattutto

di ovini costituisce attualmente il *pabulum* predominante degli Anofeli, il che può dare una spiegazione della loro elevata densità.

L'affermazione di extra-domesticità non è autorizzata soltanto dalla constatata estrema scarsezza di abitazioni e manufatti ma anche dal dato positivo della esistenza di ricoveri naturali, dai grandi ai piccolissimi, che offrono asilo agli adulti. Da tutto quello che abbiamo esposto ci pare evidente, infatti, che la vita della specie può compiersi in detta zona in maniera indipendente dalla presenza dell'uomo e delle sue attività.

Sorge ovviamente il problema dello svernamento degli adulti durante il rigido inverno che con la fitta coltre di neve allontana ogni anno i pochi uomini ed i greggi. Il problema sembra offrire tre soluzioni, ossia: morte di tutti gli individui ai rigori invernali e reinvasione graduale della zona a partire da focolai situati a più bassa quota; ovvero sopravvivenza di adulti nella zona stessa; infine il verificarsi di entrambe queste eventualità. Ora, in assenza di dati di fatto, noi desideriamo solo rilevare che, a nostro giudizio, la possibiltà di uno svernamento *in loco* sussiste; precisamente, nei ricoveri di animali selvatici e particolarmente in quelli del Ghiro che è l'abitatore predominante del bosco e che sverna in letargo nelle cavità di Faggi. In proposito richiamiamo l'attenzione sulle osservazioni riferite in altre note (D'ALESSANDRO e Coll., 1954; MARIANI e CEFALÙ, 1954) di femmine di *labranchiae* catturate in una piccola grotta abitata da Pipistrelli in Provincia di Ragusa e quelle ripetute, sempre di *labranchiae*, in cunicoli di conigli in territori delle Provincie di Palermo, Ragusa e Trapani, *e ciò in pieno inverno.*

Per ciò che si riferisce alla reinvasione della zona da focolai lontani occorre riflettere che nella stagione invernale, non soltanto la zona di Bivieri e M. Sori, ma anche un largo perimetro del raggio di oltre 15 chilometri intorno ad essa, è coperta di neve. Ciò induce a ritenere che il reingresso nella zona, del *labranchiae,* si compia nella tarda primavera. In ogni caso ci proponiamo di chiarire con ulteriori osservazioni questo punto.

Vale la pena di sottolineare fra i rilievi da noi fatti a M. Sori che il *labranchiae* punge all'aperto, anche nelle ore pre-crepuscolari, e si dimostra, come abbiamo personalmente sperimentato, particolarmente aggressivo. Ed ancora, confermando una precedente osservazione (D'ALESSANDRO e MARIANI, 1948), abbiamo constatato che l'alata segue l'uomo nei suoi spostamenti accompagnandolo fin nell'abitazione.

* * *

I dati emersi dal presente studio e da quelli precedenti, in quanto valgono a mettere in evidenza e definire i vari aspetti della vita extra-domestica dell'*A. labranchiae,* trovano ampio riscontro nelle osservazioni fatte in Sardegna e recentemente riferite nella pubblicazione di LOGAN « The Sardinian Project ».

Le constatazioni fatte circa: altitudine dei focolai, possibilità di vita in ricoveri selvatici in zone deserte dall'uomo, le caratteristiche dello svernamento e la nutrizione del *labranchiae* su animali selvatici, collimano con le nostre osservazioni. E non v'è dubbio che i rilievi fatti recentemente in Sardegna e in Sicilia completano le conoscenze sulla storia naturale di questa specie, finora conosciuta come antropofila e domestica. Contro la validità di questi presunti atteggiamenti del *labranchiae* ci siamo pronunziati già da alcuni anni (D'ALESSANDRO e MARIANI, 1948). E' possibile, ora, misurare adeguatamente le immense difficoltà che si oppongono a programmi di eradicazione della specie.

RIASSUNTO

Viene descritto un *habitat* montano dell'*A. labranchiae* (M. Sori e sue pendici, m. 1270 - m. 1847, Monti Nebrodi, Prov. di Messina) confermando in detta zona le precedenti osservazioni sulla vita extra-domestica della specie.

La zona studiata mostra la presenza di una densa popolazione pura di *A. labranchiae* e le osservazioni fatte portano a ritenere che questa specie ha, in detto ambiente, possibilità di vita non legate a condizioni create dall'uomo.

I rilievi emersi dal detto studio, che collimano con quelli resi noti per la Sardegna completano la conoscenza della biologia di questa specie.

I caratteri di domesticità e di antropofilia attribuiti alla specie sono conseguenza di adattamento secondario nel tempo. Ma la specie non ha mai perduto la sua originaria capacità di vita selvaggia che si rivela particolarmente nel tempo presente in seguito alla distruzione, operata dagli insetticidi, di quella quota dell'insetto alato che si ricovera nelle abitazioni.

SUMMARY

The author describes a mountain habitat of *A. labranchiae* (Mount Sori and its slopes, 1270-1847 metres of altitude, Nebrodi Mountains, Messina Province), thus confirming the preceding findings on the outdoor habits of this species in that zone.

The zone under study shows the presence of a dense, pure population of *A. labranchiae* and the observations lead to the belief that this species, in the above mentioned habitat, may possibly live under natural conditions indipendent from those created by man.

These findings, which agree with those from Sardinia, complete the knowledge on the biology of this species.

The domestic and anthropophilic characters attributed to *A. labranchiae*, are consequent to a secondary adaptation in the ages. However, this species has never lost its originary capacity of living a wild life. This condition is more evident at present as a consequence of the destruction, by insecticides, of that portion of the mosquito adult population which finds shelter in dwellings.

BIBLIOGRAFIA

CEFALÙ M. (1953): *Riv. di Malariol.*, XXXII, 3-5.

CEFALÙ M. e TERMINELLO L. (1954): *Riv. di Parass. 15.*

D'ALESSANDRO G., CEFALÙ M., CRACOLICI M., DE GRAZIA G., e MARIANI M. (1954): *Ann. San. Pubbl.* (in corso di stampa).

D'ALESSANDRO G. e MARIANI M. (1948): *Giorn. di Sc. Nat. ed Econ. di Palermo 45*, Sez. II, Mem. N° 1.

MARIANI M. e CEFALÙ M., (1954): *Riv. di Parass. 15.*

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

OSSERVAZIONI SULLA PENETRAZIONE DELLE CERCARIE DI *SCHISTOSOMA BOVIS* (SONSINO, 1876) NELLA PELLE DEL CONIGLIO

SALVATORE DEIANA (*)

GORDON e GRIFFITHS (1951) studiarono il comportamento della cercaria dello *Schistosoma mansoni* sulla pelle del topino ed accertarono che essa attraversa la cute, oltre che per fatti meccanici (attivi movimenti del corpo), per l'azione litica che, sui tessuti dell'ospite, esercitano particolari sostanze secrete dalle ghiandole cefaliche anteriori e posteriori della suddetta forma larvale. Gli AA. osservarono, inoltre, che detta cercaria, a contatto della cute, dapprima si dispone perpendicolarmente alla superficie epidermica ed allora perfora lo strato corneo per azione meccanica (rapidi movimenti del corpo) e, specialmente, per l'azione litica del secreto delle ghiandole cefaliche anteriori. Indi, il parassita si affonda nella soluzione di continuo prodotta e migra, disponendosi orizzontalmente fra lo strato corneo e lo strato malpighiano.

In questa prima fase del processo di penetrazione della cercaria nella cute, si esaurisce il secreto delle ghiandole cefaliche anteriori e si riduce notevolmente quello delle ghiandole cefaliche posteriori; la larva perde allora l'appendice posteriore (coda). Successivamente, il parassita guadagna i tessuti più profondi disponendosi un'altra volta in posizione verticale rispetto alla superficie cutanea.

STANDEN (1952) avrebbe notato, inoltre, la penetrazione delle cercarie negli spazi linfatici del cellulare sottocutaneo; fenomeno che GRIFFITHS (1953), non avendolo repertato, mise in dubbio.

Orbene, nessuna osservazione fu finora fatta sulle modalità che segue la cercaria dello *Schistosoma bovis* nell'attraversare la pelle degli ospiti definitivi. E, quì, si vogliono illustrare, appunto, alcune osservazioni fatte sul comportamento della suddetta cercaria a contatto della cute del coniglio.

(*) *Università di Sassari - Istituto di patologia generale e anatomia patologica veterinaria e C. N. R. Centro di studio per la parassitologia veterinaria* (Direttore: Prof. A. CARTA).

Le esperienze furono condotte sopra detta specie animale dato che è anch'essa ospite definitivo del parassita perfetto (BRUMPT, 1939; CARTA, 1954) e dato che tra i conigli è più facile trovare soggetti con cute perfettamente sana.

Ciò, è difficile trovare, invece, tra gli ovini ed i bovini, specialmente nei mesi di luglio, agosto e settembre, vale a dire nel periodo durante il quale si possono istituire le esperienze in parola perchè solo allora si possono avere le cercarie dello *Schistosoma bovis*.

ESPERIMENTI.

Le esperienze furono condotte sopra 12 conigli a mantello bianco, in ottime condizioni generali, dell'età di 6 mesi circa e del peso medio di gr. 1750.

Le cercarie di *Schistosoma bovis* furono ottenute da 3.000 esemplari di *Bulinus contortus* naturalmente infesti e raccolti in piccole paludi ed acquitrini dei territori dei comuni di S. Teodoro (Nuoro) e S. Teresa di Gallura (Sassari). Le cercarie furono ottenute immergendo i suddetti molluschi in acqua a 30°C. circa. Così fu possibile ottenere una buona concentrazione di parassiti specie nella parte più superficiale dell'acqua d'immersione.

I conigli furono anestetizzati con etere per evitare che loro eventuali bruschi movimenti disturbassero lo svolgimento dell'esperienza. Per l'esperimento furono scelte zone di cute della regione addominale le quali, per ottenere risultati più attendibili, vennero accuratamente rasate con forbici; cioè, non si usò il rasoio per evitare quelle scarificazioni, anche minime che, generalmente, si determinano con detto mezzo e che avrebbero potuto infirmare o generare dubbi sul risultato delle esperienze. A dette zone di cute si applicarono poi piccoli cilindri di sostanza plastica di 1 cm. di diametro per 2 cm. d'altezza i quali furono colmati con l'acqua ricca di cercarie. Ogni applicazione durò in media 30'.

Non fu possibile determinare il numero esatto delle cercarie messe a contatto, ma all'esame dell'acqua versata nei cilindri prima di iniziare l'esperimento si calcolò, a grosso modo, che il loro numero oscillava da 50 a 60. Sulla porzione di cute in esperimento non si verificò arrossamento, nè prurito e nè altri fenomeni di qualche interesse. A fine esperienza, nell'acqua residua, si riscontrarono rare cercarie per lo più morte o, se vive, prive di appendice caudale. Ciò, fece pensare che si trattasse, forse, di esemplari a vitalità già ridotta dai trattamenti cui furono sottoposti prima ancora di metterli a contatto con la cute.

I conigli furono divisi in tre lotti di quattro soggetti ciascuno e l'area di cute in esperimento fu asportata, in ciascun gruppo di soggetti rispettivamente dopo 12, 24 e 48 ore.

Dai frammenti di pelle asportati, distesi su pezzetti di sughero per evitare coartamenti provocati dal liquido fissatore (formalina di Policard), dopo inclusione in paraffina, furono allestite sezioni istologiche in serie, le quali fu-

rono colorate con metodi comuni (ematossilina-eosina) e speciali (van Gieson, Mallory, May Grünwald-Giemsa, ecc.).

REPERTI ISTOLOGICI.

Nelle sezioni istologiche allestite dai pezzi di cute asportati dai conigli 12 ore dopo l'applicazione delle cercarie si riscontra che la maggior parte dei parassiti ha superato lo strato corneo e lo strato ~~lucido~~ e si trovano allogati in piccole loggie scavate nello spessore dello strato mucoso del Malpighi (Fig 1 e Fig. 2).

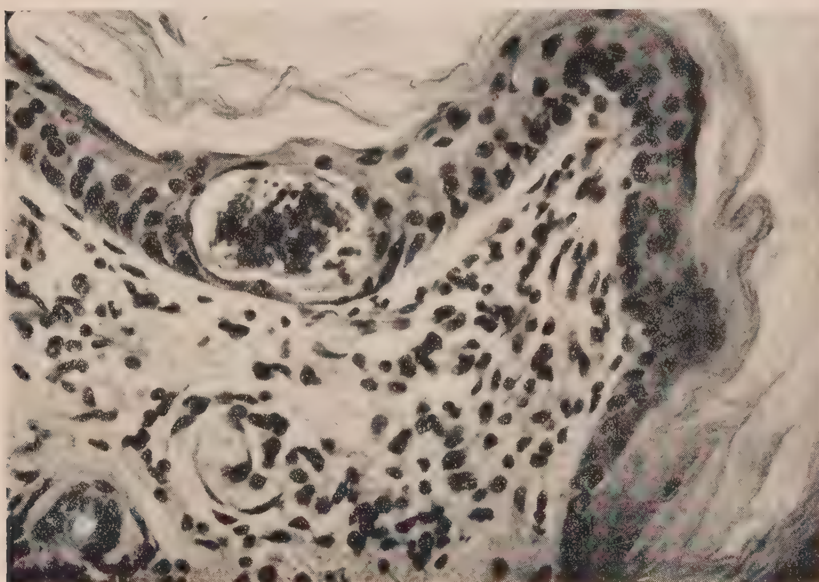


Fig. 1 - Sezioni di cute 12 ore dopo l'applicazione delle cercarie. Cercaria nello spessore dell'epidermide.
Universal-Reichert Obb. 40x Ocul. 8x.

Le cavità nelle quali le cercarie si annidano sono limitate più internamente da cellule epidermiche fortemente compresse e spesso in preda a manifesti fenomeni regressivi del citoplasma e del nucleo (degenerazione palloniforme, cariolisi, carioressi ecc.). Gli elementi più esterni, invece, sono rigonfi, con citoplasma omogeneo, disseminato di corpuscoli colorati intensamente dalle sostanze basiche; raramente hanno perduto i loro reciproci rapporti.

Frammenti del corpo del parassita, disposti orizzontalmente, rispetto alla superficie cutanea, si repertano fra lo strato superficiale e lo strato mucoso dell'epidermide (Fig. 3). Con molta verosimiglianza, trattasi delle appendici

caudali che le cercarie perdono prima di guadagnare lo strato mucoso del Malpighi, dato che, gli esemplari ivi annidati risultano tutti privi di coda.

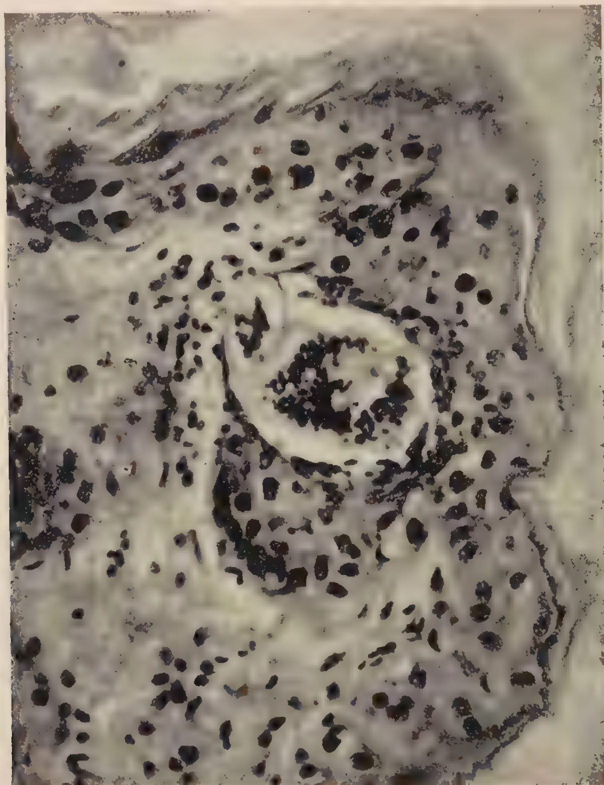


Fig. 2 - Sezione di cute 12 ore dopo l'applicazione delle cercarie. Cercaria al limite dello strato epidermico.
Universal-Reichert Obb. 40x Ocul. 8x.

Gli annessi cutanei sono rispettati e nel derma non si repertano parassiti nè altri fenomeni degni di rilievo.

Nelle sezioni istologiche dei pezzetti di cute asportati dai conigli 24 ore dopo l'esperimento, le cercarie si repertano, invece, esclusivamente nello spessore del derma (Fig. 4). Cioè a carico dell'epidermide non si riscontrarono che i frammenti anzidetti del corpo dei parassiti disposti tra lo strato lucido e lo strato mucoso del Malpighi, e che, come fu prima detto, potrebbero rappresentare le appendici caudali.

Delle nicchie che, nelle sezioni di pelle asportata 12 ore dopo l'esperimento, nello strato mucoso del Malpighi albergavano le cercarie non esiste più traccia; mentre, i parassiti, abbastanza numerosi, si riscontrano sia nello strato papillare che nello strato reticolare del derma. Essi non presentano però

uguale orientamento: accanto ad esemplari in posizione orizzontale rispetto alla superficie cutanea, si osservano esemplari in posizione obliqua ed anche in posizione verticale. Ma tutti risultano disposti tra fasci collageni divaricati ed un poco rigonfi rispetto alla norma.

I parassiti non risultano circoscritti da ammassi di elementi cellulari di natura infiammatoria. Cellule d'infiltrazione parvicellulare con prevalenza di granulociti eosinofili si repertarono, invece, anche se in modica quantità ed irregolarmente distribuiti, in tutto lo spessore del derma, e specialmenoe nello strato papillare.

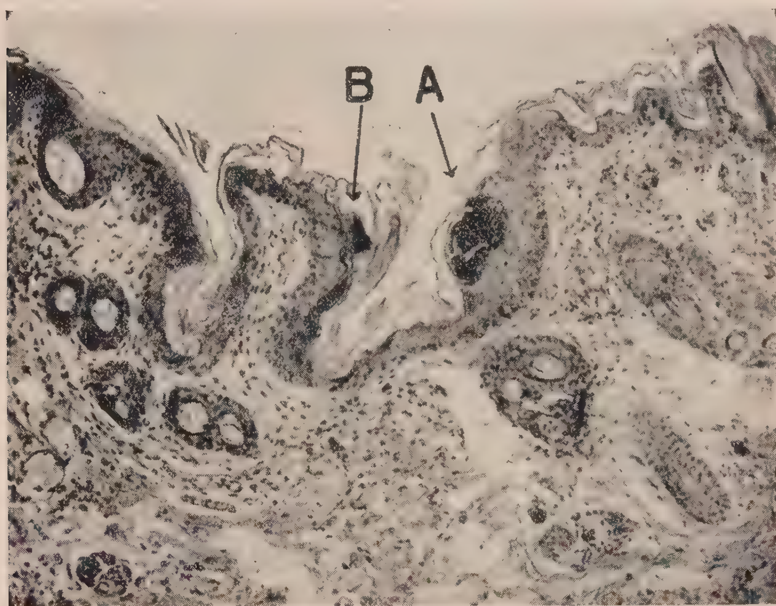


Fig. 3 - Sezione di cute 12 ore dopo l'applicazione delle cercarie.
A) cercaria nello spessore dell'epidermide.
B) frammento dell'appendice caudale del parassita.
Universal-Reichert Obb. 40x Ocul. 8x.

La rete sanguifera, come quella linfatica, risulta ectasica e specialmente in prossimità delle cercarie, si hanno piccole emorragie. Gli annessi cutanei, non presentano particolarità degne di rilievo.

Qualche piccola emorragia si reperta inoltre, nel derma dei pezzetti di cute asportati dai conigli 48 ore dopo l'applicazione delle cercarie. Anzi, questo reperto, complicato da una modica infiltrazione di granulociti eosinofili nello strato papillare e nello strato reticulare, rappresenta la più comune alterazione della cute asportata ai suddetti conigli. Cioè, nei preparati istologici allestiti dai pezzetti di cute asportati dai conigli 48 ore dopo l'applicazione

delle cercarie non si riscontrano più i parassiti, sebbene loro traccie siano indicate dalla presenza, oltrechè delle suddette emorragie, dei frammenti delle appendici caudali dei parassiti nello spessore dell'epidermide.



Fig. 4 - Sezione di cute 24 ore dopo l'applicazione delle cercarie. Cercaria disposta nello spessore del derma. Universal-Reichert Obb. 40x Ocul. 8x.

Conclusioni.

Dai fenomeni osservati a carico della cute di coniglio esposta all'azione della cercaria di *Schistosoma bovis* sembrerebbe di poter trarre le seguenti conclusioni:

1) La cercaria dello *Schistosoma bovis* con relativa facilità attraversa la cute del coniglio e si reperta dopo 12 ore nello spessore dello strato mucoso del Malpighi, dopo 24 ore nello strato dermico, mentre dopo 48 ore, non è più reperibile, forse, perchè ha già guadagnato il circolo sanguigno o linfatico, at-

traverso il quale raggiunge la normale sede per evolvere in parassita perfetto (sistema venoso mesenteriale);

2) la forma larvale dello *Schistosoma bovis* perfora la cute disponendosi dapprima perpendicolarmente alla superficie cutanea, ed allora attraverserebbe lo strato corneo sia per azione meccanica (attivi movimenti del suo corpo) che per azione litica (secreto delle ghiandole di penetrazione), così come fu già accertato per le cercarie di altri Schistosomi (*Schistosoma mansoni*, ecc.). Poi il parassita si affonda nella cute disponendosi parallelamente agli strati epidermici ed allora esso migra, anche se per breve tempo, fra lo strato lucido e lo strato mucoso del Malpighi. Arrivato nel derma il parassita migra, invece, senza un preciso orientamento, molto verosimilmente perchè, allora, esso cerca la via più breve per guadagnare i capillari sanguigni o linfatici a mezzo dei quali giunge nella sede definitiva (sistema venoso mesenteriale) per evolvere in parassita perfetto;

3) i fenomeni reattivi che si verificano nella cute di coniglio che per la prima volta viene a trovarsi a contatto con la cercaria dello *Schistosoma bovis* sono di lieve entità (fenomeni regressivi degli elementi epiteliali, modica infiltrazione di granulociti eosinofili nel derma, iperemia passiva, qualche piccola emorragia, ecc. ecc.) e con la scomparsa del parassita generalmente si ha, in breve tempo, la *restitutio ad integrum* della parte lesa.

RIASSUNTO

L'A. illustra come si comportano le cercarie di *Schistosoma bovis* nell'attraversare la cute del coniglio e mette in rilievo che i parassiti sono reperibili dopo 12 ore nello strato mucoso del Malpighi, e dopo 24 ore nel derma. Quindi l'A. fa presente che i fenomeni reattivi - infiammatori che si verificano a carico della cute di conigli esposti per la prima volta all'azione delle cercarie sono di lieve entità.

SUMMARY

The behaviour of *Schistosoma bovis* cercariae during their invasion of the abdominal skin of rabbits is described. It is remarked that the parasites after 12 hours of exposure are found into the Malpighian layer and after 24 hours into the dermis. According to the author the cutaneous tissue changes of rabbits exposed for the first time to the cercariae, are small.

BIBLIOGRAFIA

BRUMPT E. (1939): Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*. Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. *Ann. de Paras. Hum. et Comp.*, 8, 17-50.

CARTA A. (1954): Dermatite papulare da cercarie di *Schistosoma bovis* nell'uomo. *La Ricerca Scientifica, 3,* 569-574.

GRIFFITHS R. B. (1953): Further observation on the penetration of mammalian skin by the cercariae of *Schistosoma mansoni* with special reference to the effects of mass invasion. *Ann. Trop. Med. and. Paras, 47,* 86-94.

GORDON R. M. e GRIFFITS R. B. (1951): Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, togheter with an account of certain morfological canges observed in the newly penetrated larvae. *Ann. Trop. Med. and Paras., 45,* 227.

STANDEN O. D. (1952): The penetration of cercariae of *Schistosoma mansoni* into the mouse *Trans. R. Trop. Med. Hyg, 46,* 384.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

GIARDIA OVIS IN THE INTESTINE OF *NEMATODIRUS FILLICOLLIS* - A PARANEOXENOUS ASSOCIATION

A. S. DISSANAIKE (*)

During a survey of protozoa in helminths an examination of nematodes from sheep was made, and on several occasions specimens of *Nematodirus fillicollis* were found with their intestines teeming with flagellates belonging to the genus *Giardia*. As this was found to be quite a frequent phenomenon, a study of the behaviour and morphology of these forms was made, and a comparison of their structure with that of the *Giardia* inhabiting the small intestine of sheep was undertaken.

In the literature to date several reports are met with of flagellates encountered in the intestines of parasitic nematodes. THEILER and FARBER (1933, 1936), found *Trichomonas muris* of the laboratory white mouse in the intestines of *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata*. In 1925 THOMSON described a *Giardia* «living and multipling» in the intestine of the bursate nematode *Viannella* sp. from the small intestine of the viscacha (*Viscacia viscacia*). No cysts were seen in the intestines of these nematodes. Unfortunately in this case no specimen of *Giardia* either free or encysted was found in the faecal contents of the intestine of the viscacha, and although the morphological appearances of the *Giardia* suggested that it was identical with *G. viscaciae* described by LAVIER in 1923, no definite conclusions could be reached. The next report was by GRAHAM (1935) who found a *Giardia* in the intestines of several specimens of *Cooperia oncophora* obtained from a young bull. The infections were light and most numerous in the dilated portion of the intestine just anterior to the anus. Some of the specimens of *Giardia* were seen attached to the surface of the intestinal cells by their suckers. They were encountered in 6 out 21 females and in none of 8 males. Here too no *Giardia* sp. was detected in the mucus of the bull's intestine, and so no comparison could be made in order to arrive at a definite conclusion regarding the nature of the association.

(*) *Department of Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine*

MATERIAL AND METHODS.

The nematodes were obtained from the London Metropolitan Cattle Market, Islington. They were brought with the intestinal contents, sorted out as quickly as possible and examined in saline. After the behaviour of the protozoa in the intestinal lumen of the worms was studied a number of worms were transferred into a tube of saline and left in the 37°C room in order to ascertain the length of survival of the worms and of the protozoa in them. Permanent stained preparations of the organism were made by dissecting the guts of the worms and making dry and wet smears. The former were stained in Giemsa stain for 12-16 hours and the latter were fixed, in Schaudinn's Fluid and stained in Heidenhain's iron-haematoxylin. A few infected worms were fixed in Carnoy's Fluid (6:3:1) sectioned at 5 μ and stained by the Giemsa-Colophonium method. Drawings and measurements were made from these preparations with the aid of a camera-lucida. Giardias obtained from the small intestine of sheep were stained with Giemsa stain after dry fixation as this was found to give the best results, especially when left in stain for over 12 hours. As will be described later, the motionless Giardias which were found in large quantities amongst the blood meal of several specimens of *Bunostomum trigonocephalum* were similarly prepared for study.

OBSERVATIONS ON FRESH MATERIAL.

Since the first observation, specimens of *Nematodirus fillicollis* obtained from nearly every batch of sheep on different occasions showed *Giardia* sp. to a greater or less extent. It was found that although the worms could be kept alive in saline at 37°C for over 24 hours, the Giardias in them soon became motionless and were not recognisable after 4-5 hours. The table below (Table 1) summarises the findings on fresh material on different occasions.

TABLE I.

Date	No. worms examined	Males	Females	Time lapse since collection	Degree of Infect.
30. X .53	Over 20	nil	20 +ve	3 Hrs.	Heavy
11.XI.53	» 20	nil	20 +ve	1½ »	Heavy
18.XI.53	6	2 —ve	4 +ve	3 »	Light
26.XI.53	6	1 —ve	5 +ve	1½ »	Heavy
9.XII.53	20	3 —ve	17 —ve	3 »	nil
16.XII.53	1	nil	1 +ve	4 »	V. light

It is interesting to note that while nearly every *Nematodirus* examined contained *Giardia*, no males were seen to harbour it, although it must be admitted that the number of males examined was small. GRAHAM's findings in

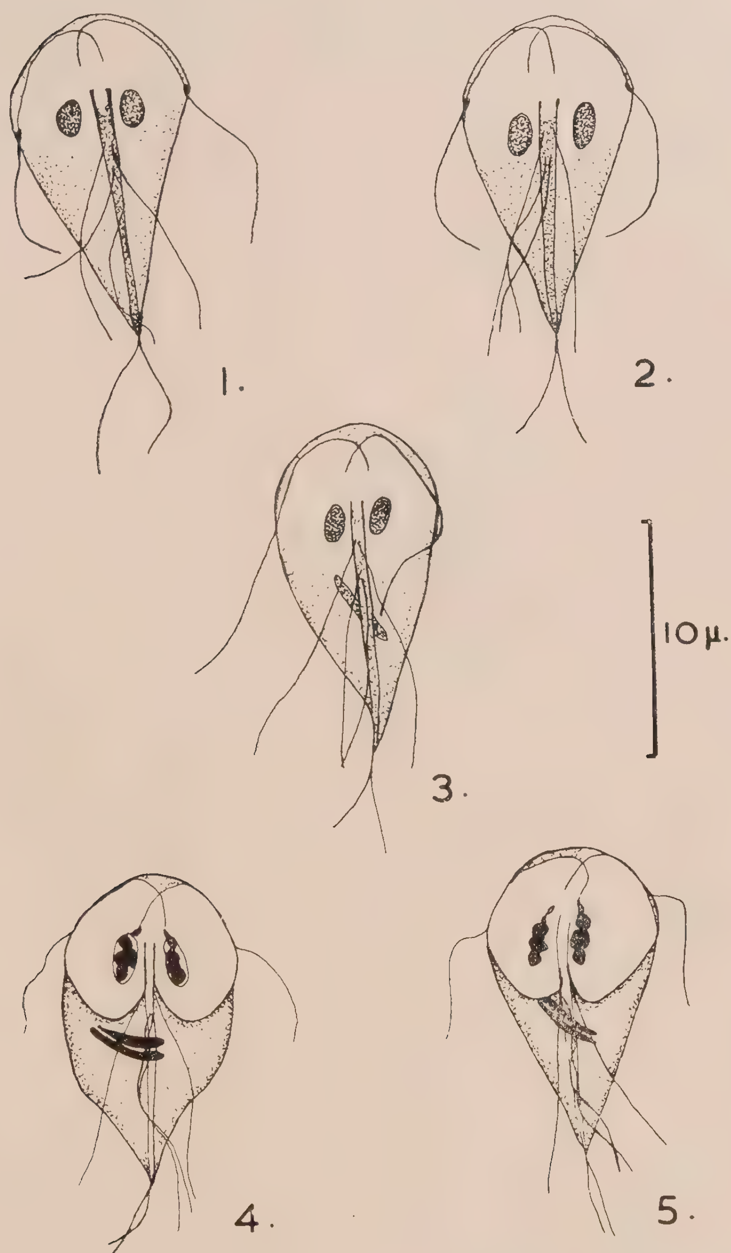


Fig. 1-3 Giardias from *Nematodirus fillicollis* (Giemsa).

Fig. 4-5 Giardias from *N. fillicollis* (Heidenhain).

the case of *Cooperia oncophora* were similar, for he found that none of eight males were infected. These observations may be explained as due to the physiological difference between the two sexes.

The difference in the degree of infection in worms examined on separate occasions, as seen in the table, may be explained as due to the time lapse between the collection of the worms and their examination. The absence of any infection in the batch of worms collected on 9.XII.53 may either mean that the worms were examined too late, or that the particular sheep from which these worms came was free from giardial infection.

Observations made on heavily infected worms showed that the Giardias were most numerous in the hind quarter of the intestine as was the case in GRAHAM's report. They were quite active either moving about in the intestinal lumen or attached to the surface of the intestinal cells by their ventral sucker-surface. In the latter case the rapid movements of the posterior flexible portions of the body of the organisms were very characteristic. No cysts were seen in any of the worms examined, nor was there any trace of the protozoa in any other part of the worms than the intestine.

DESCRIPTION OF THE GIARDIAS.

As the dry-fixed preparations stained in Giemsa stain were best for most details of structure, almost all the measurements and drawings were made from these. The *Giardia* sp. from *Nematodirus* (Figs. 1-5; 8-9) measured 13.2-14.25 μ in length by 6.9-7.6 μ in breadth. The ratio of length to breadth was 1.8-2.1. The averages of all these values were respectively 13.7 μ, 7.24 μ and 1.89.

The structure of the organism was quite typical. The antero-lateral pair of flagella arose from two separate granules from the contra-lateral sides a little anterior to the two nuclei, crossed at the anterior edge of the organism and remained attached to the lateral edge of the sucker till their point of emergence, where in a few specimens (Fig. 1-3) a thickened portion of the flagellum gave the impression of a secondary granule. This structure was first observed by BENSEN (1908) who called it the « basal granule », and he found these basal granules at the points of exit of the antero-lateral and caudal flagella. Since then KOFOID and CHRISTIANSEN (1915), BOECK (1917, 1919) and SIMON (1921, 1922) have observed and remarked on these structures. Some of these workers consider them as secondary blepharoplasts, while others like HAIBA (1952) think they are produced by deposits of stain at the angle between flagellum and body. However, since these « basal granules » are so inconsistent, and when they do appear are seen to be definite thickenings of the flagella it is concluded that they are probably caused by the rapid lashing of the flagella just before death of the organism producing a denser spot at the junction of the attached and free portions of the flagella. The remaining

flagellar origins and arrangements did not show any deviation from the standard pattern. The axostyles were clearly double especially at the anterior ends where they began in a pair of blepharoplasts which were medial to those of the antero-lateral flagella.

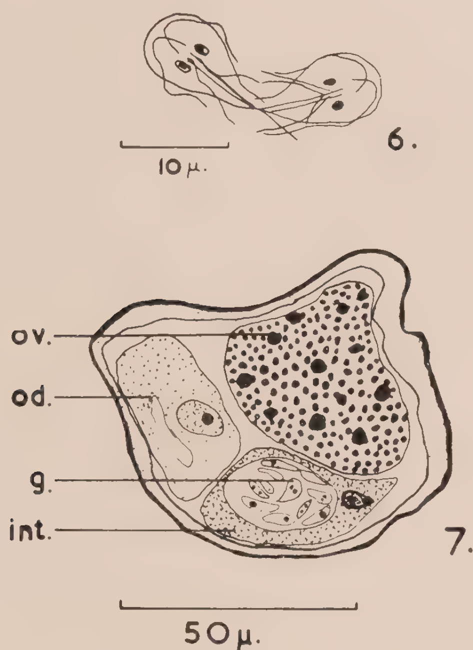


Fig. 6. Dividing form from intestine of *N. fillicollis* (Giemsa).

Fig. 7. Section of *N. fillicollis* showing Giardias in intestinal lumen (Giemsa-Colophonium).

Ov. - ovary.
od. - oviduct.
int. - intestine.
g. - Giardias in lumen.

The nuclear details were not shown by Giemsa techniques appearing merely as homogeneous oval bodies measuring on an average 1.68 by 0.84 μ. In specimens stained in iron-haematoxylin they seemed to be made up of 3-4 compact chromatin masses. No rhizoplastic connections were found between nuclei and either of the blepharoplasts, although in Heidenhain stained smears a connection between the nuclei and the blepharoplasts of the antero-lateral flagella was sometimes seen. The sucking discs were only clearly seen in Heidenhain preparations, while the parabasal bodies which were mostly double, stained best in Heidenhain stained preparations and in Giemsa pre-

parations stained for 16 hours or more. They were placed at an oblique angle to the axostyles and measured on an average 1.9 μ in length.

In one smear preparation dividing trophozoite stages of the *Giardia* were seen (Fig. 6), which appeared to be the end stages of longitudinal binary fission.

Fig. 7 shows a section of an infected *Nematodirus* with the Giardias in the lumen of the intestine.

In 5 out of 14 specimens of *Bunostomum trigonocephalum* large numbers of motionless Giardias were seen with the blood meal in the intestines of the worms. They were undoubtedly Giardias of sheep that had been ingested by the worms, and the fact that in *Bunostomum* they were not actively motile as was the case in *Nematodirus,* suggested that in *Bunostomum* at any rate they were Giardias of sheep that had been accidentally swallowed by the worms, and that the intestine of *Bunostomum* was not a suitable site for their growth and multiplication. It must also be mentioned here that several specimens of

TABLE II.

Giardia	Length	Breadth	Lenght: Breadth
Nematodirus	13.7(13.2-13.7) μ	7.2(6.9-7.6) μ	1.89(1.80-2.05)
Bunostomum	14.39(13.05-15.5) μ	7.82(7.5-8.0) μ	1.85(1.75-1.95)
Sheep (Present paper)	13.1(12.4-13.8) μ	7.08(6.9-7.35) μ	1.85(1.79-1.97)
Goats (NIESCHULZ, 1924)	14.0(11.0-17.0) μ	7.5(6.0-8.5) μ	1.8(1.82-2.0)

Trichostrongylus spp. from sheep were examined but no Giardias were seen in them. Table II gives a comparison of the measurements of Giardias from *Nematodirus*, *Bunostomum* and from sheep. The rather higher values for those of *Bunostomum* may be due to the fact that the Giardias were already dead for some time and hence spread out more on fixation. Apart from this they all seem the same. Figs. 8-13 show Giardias from *Nematodirus*, *Bunostomum* and sheep drawn to the same scale for comparison.

DISCUSSION.

There are two questions to be settled before deciding on the true significance of the above findings. First, whether the *Giardia* found in the intestine of *Nematodirus fillicollis* is a new species peculiar to it, or, secondly, if it is in fact the *Giardia* of sheep that has been accidentally swallowed and has found the intestine of the nematode a suitable site to live in.

The two previous records of *Giardia* occurring in the intestines of the trichostrongyles *Viannella* sp. (THOMSON 1925), and *Cooperia oncophora* (GRAHAM 1935), have already been mentioned. In these cases the writers were

unable to decide definitely whether they were dealing with *G. viscaciae* Lavier, 1923 and *G. bovis* Fantham, 1921 respectively. THEILER and FABER (1938 and 1936) were certain that the trichomonads they found in the intestines of *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata* were the same as *T. muris* of

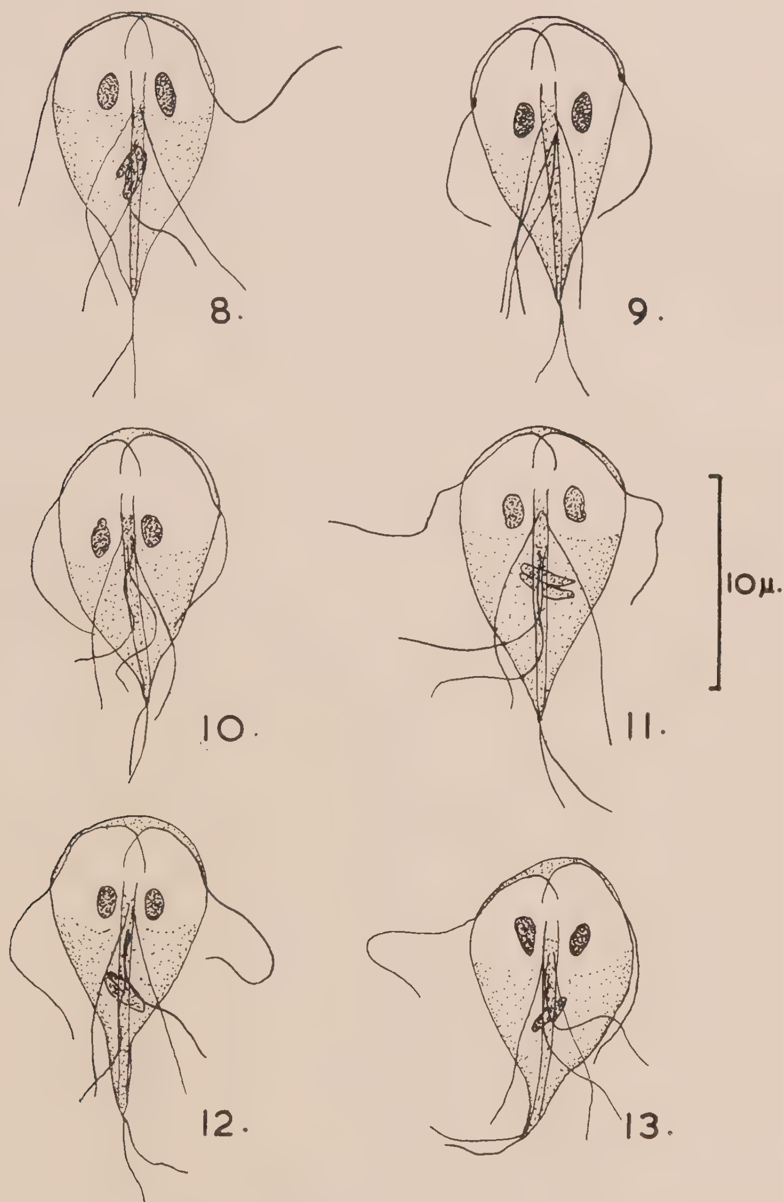


Fig. 8-9. Giardias from *N. fillicollis*.
Fig. 10-11. » » *B. trigonocephalum*.
Fig. 12-13. » » *sheep*.

the mouse. CALLOT (1942) described a case of *Giardia muris* in the intestinal caeca of the trematode *Echinostoma revolutum* from the intestine of the white mouse. He refers to this association as one of *paraneoxenie* a term originally proposed by BRUMPT and LAVIER (1936) for the type of hyperparasitism exhibited by an opaline, *Zelleriella* sp. in the body of which an amoeba was found, both the opaline and the amoeba being normally inhabitants of the digestive tract of a toad *Paludicola signifera*. This term was used to describe the type of association where one intestinal parasite invades the digestive tract of another intestinal parasite, that shares the same habitat in the host's intestine, thereby making this parasite its new host. CALLOT was of opinion that since *Giardia* is normally very difficult to culture, the intestinal caeca of the trematode must have been a suitable site for it to live in and even multiply. It is therefore reasonable to assume that in this particular case too we are dealing with an example of a paraneoxenous association. The morphological appearances of *Giardia* in the intestines of *Nematodirus* and of sheep are undoubtedly the same, as the various figures and table indicate. Furthermore if *Giardia* in *Nematodirus* was peculiar to it one would have expected to find cysts in the intestines of the worms.

Finally it is necessary to clarify the nomenclature of *Giardia* of sheep. This organism was first observed by GRASSI (1881) who mentioned its existence in sheep but did not give it a special name or description as he probably considered it as identical with the human species which he called *Megastoma entericum*. It was again stated as occurring in sheep by HEGNER (1924) who also did not name or describe it. The only description met with in the literature was by TURNER and MURNANE (1932) who reported it from sheep in Victoria, Australia, gave a description of the organism, and compared its measurements with those of some other mammals. They concluded that « the form described by us resembles the other species from mammals, but is smaller than the human form wich GRASSI apparently regarded it as identical. It is about the same length, but is not so broad as *G. caprae* described by NIESCHULZ (1923) in the goat, and most closely approximates the *G. canis* of the dog ». They did not name the organism, but NEVEU-LEMAIRE (1943) called it *G. ovis* without giving any description. The measurements of the *Giardia* sp. described in the present work fall within the ranges given by TURNER and MURNANE, and although they agree very closely with the measurements of *G. caprae*, ANSARI'S (1952) suggestion that it is probably synonymous with *G. caprae* cannot be accepted until by cross-infection experiments it can be clearly shown that the two species are identical. For the present then *G. ovis* NEVEU-LEMAIRE, 1943 must be regarded as valid.

It can therefore be concluded that present report of a *Giardia* in *Nematodirus fillicollis* of sheep it yet another example of a paraneoxenous association where the *Giardia* is none other than *G. ovis* of sheep.

ACKNOWLEDGMENTS.

I wish to express my thanks to Professor P. C. C. GARNHAM, Professor J. J. C. BUCKLEY, and Dr. P. L. LE ROUX for their help and advice in this work. To Mr. E. F. MCCLEARY, Chief Veterinary Officer, Mr. R. G. HALCROW, Assistant Veterinary Officer, and Mr. H. T. YELLAND, Meat Inspector, of the London Metropolitan Cattle Market, Islington for their kindness in providing the facilities for obtaining the material from sheep.

RIASSUNTO

L'Autore descrive una Giardia che vive e si moltiplica nell'intestino del tricostrongilo della pecora, *Nematodirus fillicollis*. Paragonando questo parassita con *Giardia ovis*, ottenuto dall'intestino della pecora, viene concluso che le due forme sono identiche.

L'Autore considera questo come un caso di associazione paraneoxenica, di cui si hanno altri esempi nella letteratura.

SUMMARY

A Giardia living and multiplying in the intestine of the sheep trichostrongyle *Nematodirus fillicollis* is described. A comparison of this parasite with *Giardia ovis* obtained from the intestines of sheep has been made and it is concluded that the two forms are identical.

Further examples of this type in the literature have been reviewed, and this is regarded as yet another instance of a paraneoxenous association.

BIBLIOGRAPHY

ANSARI, M. A. R. (1952). « Contribution à l'étude du genre *Giardia* Kunstler, 1882 (Mastigophora : Octomitidae) Tableau des espèces connues et de quatre espèces nouvelles ». *Ann. Parasit. hum. comp.*, *27*, 421-471.

BENSEN, W. (1908). « Bau und Arten Gattung Lamblia ». *Z. Hyg. InfektKr.*, *61*, 109-114.

BOECK, W. C. (1917). « Mitosis in *Giardia microti* ». *Univ. Cal. Publ. Zool.*, *18*, 1-26.

BOECK, W. C. (1919). « Studies on *Giardia microti* ». *Ibid.*, *19*, 85-134.

BRUMPT, E., & LAVIER, G. (1936). « Sur l'hyperparasitisme d'Opalines par des *Amibes* ». *Ann. Parasit. hum. comp.*, *14*, 349-358.

CALLOT, J. (1942). « Sur un nouveau cas de Paraneoxénie ». *Ann. Parasit. hum. comp.*, *19*, 51-52.

DOLLFUS, R. PH. (1946). « Parasites (Animaux et végétaux) des Helminthes ». *Encyclopédie Biologique.* Paris, *27*, 71-72.

GRAHAM, G. L. (1935). « *Giardia* infections in a nematode from cattle ». *J. Parasit.*, *21*, 127-128.

GRASSI, B. and SCHEWIAKOFF, W. (1881). « Beitrag zur Kenntnis des *Megastoma entericum* ». *Z. wiss. Zool.*, *46*, 143-154.

GRASSI, B. (1882). « Intorno ad alcuni Protisti endoparassitici ». *Atti Soc. ital. Sci. nat.*, *24*, 135-224.

HEGNER, R. W. (1922). « A Comparative Study of *Giardia* living in Man, Rabbit and Dog ». *Amer. J. Hyg.*, *2*, 442-454.

HEGNER, R. W. (1923). « *Giardia* and *Chilomastix* from monkeys, *Giardia* from wild cats, *Balantidium* from sheep ». *J. Parasit.*, *11*, 75-78.

HEGNER, R. W. (1930). « Host-Parasite specificity in the genus *Giardia* ». In Hegner and Andrews' *Problems and Methods of Research in Protozoology*. pp. 143-152. MacMillan, New York.

HAIBA, M. H. (1952). « Studies on the Morphology and Biology of *Giardia* ». Ph. D. Thesis. University of London.

KOFOID, C. A. and CHRISTIANSEN, E. B. (1915). « On *Giardia microti* sp. nov. from the meadow mouse ». *Univ. Cal. Publ. Zool.*, *20*, 199-234.

LAVIER, G. (1923). « Sur deux espèces nouvelles du genre *Giardia*. *G. viscaciae* de la viscache (*Viscacia viscacia*) et *G. varani* du varan (*Varanus niloticus*) ». *Ann. Parasit. hum. comp.*, *1*, 147-154.

NEVEU-LEMAIRE, M. (1943). « Traité de Protozoologie Médicale et Vétérinaire ». pp. 319-327. Vigot Frères, Paris.

NIESCHULZ, O. (1924). « Uber den Bau von *Giardia caprae* mihi ». *Arch Protistenk.*, *49*. 278-286.

SIMON, C. E. (1921). « *Giardia enterica* : A parasitic intestinal flagellate of man ». *Amer. J. Hyg.*, *1*, 440-490.

SIMON, C. E. (1922). « A critique of the supposed rodent origin of Human Giardiasis ». *Ibid.*, *2*, 406-434.

THEILER, H. and. FARBER, S. M. (1933). « *Trichomonas muris* parasitic in the oxyurid nematods, *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata* of white mice ». *J. Parasit.*, *19*. 169.

THEILER, H. and FARBER, S. M. (1936). « *Trichomonas muris* parasitic in the oxyurid nematode, *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia oblevata* from white mice ». *Parasitology*, *28*, 149-160.

THOMSON, J. G. (1925). « A *Giardia* parasitic in a bursate nematode living in the Viscacha ». *Protozoology*, *1*, 1-16.

TURNER, A. Q. and MURNANE, D. (1932). « *Giardia* in sheep in Victoria Australia ». *Austr. J. exp. Biol. med. Sci.*, *10*, 52-56.

WENYON, C. M. (1926). « Protozoology ». Vol. 1, pp. 697-711. Baillière, Tyndall and Cox, London.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

MILBEN AN MALLOPHAGEN (*)

WOLFDIETRICH EICHLER (**)

Auch zwischen den Parasiten desselben Wirtes untereinander bestehen Beziehungen. Mallophagen benützen gelegentlich *Hippoboscidae, Culicidae* oder *Siphonaptera* als Transportwirte. Umgekehrt aber sind sie neuerdings als solche für Milben bekannt geworden.

Die weitverbreitete Milbe *Myialges caulotoon* Speiser pendelt in der Regel zwischen einem Vogel und einer diesen parasitierenden Hippoboscide hin und her. Ihre Eier legt sie dabei an die letztere. Bei *Anatidae,* die nicht von Hippobosciden besucht werden, wählt diese Milbe *Trinoton*-Arten als Tranportwirte. Die Milbeneier werden an den Körper dieser Mallophagen angeklebt, auch bleiben weibliche Milben an den Mallophagen sitzen. THOMPSON hat einige Beobachtungen darüber zusammengestellt.

Ich kann über einen weiteren solchen Fall berichten. H. WEIDNER sammelte am 28. III. 1943 ein *Trinoton*-Exemplar in Saloniki (Griechisch-Mazedonien) an einem *Neophron percnopterus* Linn. Die Gattung *Trinoton* lebt nur bei Anatiden. Ob die Mallophage auf den Geier übergelaufen war, als dieser an einem Anatidenkadaver sass — oder ob sie sich erst nachträglich von den von WEIDNER gleichzeitig gesammelten *Trinoton*-Stücken von einer « Anatidenart » abgesondert hatte — steht nicht fest. Wie die Abb. 1 zeigt, ist der Mallophagenleib stellenweise dicht besät mit Milbeneiern.

Bei meinen Mallophagenstudien ist mir mehrfach eine ganz andere Beziehung zwischen Mallophagen und Milben aufgefallen. Federn exotischer Vögel findet man oftmals übersät mit den leeren Hüllen der Mallophageneier. In diese nun sind nicht selten Milben eingedrungen. Bei Federmilben liegt es zunächst nahe, dass ihnen die leeren Eihüllen als willkommene Verstecke wie Hundehütten dienen könnten. Man findet die Milben gelegentlich auch paarweise darin, sodass die Milben hier die Eihüllen als Liebesnest benützt haben mögen.

(*) Beobachtungen über biologische Eigentümlichkeiten bei Mallophagen. IX.

(**) *Parasitologisches Institut der Universität Leipzig.*

Ich habe aber noch einen weiteren Verdacht! Die Milben könnten gar leicht « auf den Geschmack kommen » und die vollen Mallophageneier ausfressen. Bei der vielfältigen Lebensweise parasitärer Milben wäre hieran zu denken — und vielleicht dient die Bewehrung und Beschirmung mancher Mallophageneier der Abwehr hungriger Milben?

Zur Veranschaulichung des erwähnten Beispiels einer ganz neuartigen Vergesellschaftung zwischen Mallophagen und Milben zeigt Abb. 2 zwei Eier einer *Antimenopon*-Art von *Dichoceros bicornis* Linn. Das betreffende Material des Hamburger Zoologischen Museums stammt aus dem Zoo Hagenbeck (Hamburg-Stellingen, 31. V. 1934) in einer Herkunft aus Südsiam (« Macon Sicramat »?).





Abb. 1. - Milbeneier an den vorderen Segmenten des Abdomens einer *Trinoton* - Art (Fot. S. Siebert).

Abb. 2. - Eier von *Antimenopon* spec. an Federn von *Dichoceros bicornis*. Das rechte Ei ist geschlossen, das linke Ei offen mit eingekrochener Milbe. (Fot. S. Siebert).

In dieser Abb. 2 sehen wir rechts ein normales, bedeckeltes Mallophagenei. Das Ei selbst ist geriffelt, lieght ausserdem aber noch geschützt in einer schleierartigen Hülle.

Links auf der gleichen Abb. 2 ist ein offenes, leeres Ei an einen Federstrahl angeklebt, in welches eine Milbe eingekrochen ist. Die Milbe liegt mit dem Kopf nach unten und ist von der Seite gesehen.

Die Abb. 3 zeigt eine auf der gleichen Feder befindliche «freie» Milbe. Es dürfte sich um eine Federmilbe handeln — aber sicher zu entscheiden vermochte ich es nicht. Bei Material, das einem erst in fertigen Kanadabalsam präparaten zu Gesicht kommt, muss auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass gar nicht zum Wirtsvogel gehörige Milben nachträglich in Federlingseier eingewandert wären. Wir kennen solche Beispiele von Tyroglyphiden, die z. B. durch ihr Einkriechen in Tracheen zur Fehldiagnose der Todesursache von Bienensterben geführt hatten. Die Häufigkeit des Vorkommens von Milben in Mallophageneiern, die Art ihres Auftretens darin, und auch ihr Nachweis in offensichtlichem Frischmaterial sprechen für das nicht seltene tatsächliche Einkriechen der vogelepizoischen Milben in leere Federlingseier am lebenden Vogel. So fand ich z. B. Milben in *Myrsidea*-Eiern peruanischer *Ramphastos*-Arten, in *Oxylipeurus*-Eiern von *Ortalis araucuan squamata*, und in einem wohl von *Turdinirmus* spec. stammenden Ei an einem *Atlapetes torquatus nigrifrons*.





Abb. 3. - Federmilbe von der in Abb. 2 gezeigten Feder. (Fot. S. Nickel).
Abb. 4. - Ineinandergeschachtelte Eier zweier verschiedener Mallophagenarten von *Crypturellus* spec. (Fot. G. Bach).

In grossen Mallophageneiern an den Federn einer *Crypturellus*-Art (WEC 1618) gaben sich die Milben sogar ein Stelldichein mit den kleineren

Eiern einer enderen Mallophagenart, die mit Regelmässigkeit in das Innere leerer Eihüllen der grösseren Art gelegt worden waren. Abb. 4 zeigt ein solches grosses Mallophagenei mit einem kleinen darin; in manchen dieser grossen Eier sitzen bis fünf kleinere Mallophageneier.

ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst wird ein weiterer Fall von *Myialges* - Eiern an einer *Trinoton* - Art erwähnt. Sodann wird auf das nicht seltene Vorkommen von Milben in leeren Mallophageneiern hingewiesen. Zum Schlusse wird über das Einkleben kleinerer Mallophageneier in leere grössere berichtet. Die letzteren beiden Beobachtungen waren bisher unbekannt. Alle drei Fälle werden durch Abbildungen belegt.

RIASSUNTO

Viene anzitutto ricordato un altro caso di uova di *Myialges* su *Trinoton* sp.; si fa quindi cenno della non rara presenza di acari in uova vuote di Mallofagi, e si riferisce infine sull'incollamento di uova di Mallofagi più piccoli su quelle di più grandi. Le ultime due osservazioni non erano state finora mai segnalate. Tutti e tre i fatti sono documentati da fotografie.

SUMMARY

The author points out to a further case of eggs of *Myialges* on *Trinoton* sp. and reports on the finding of mites in *Mallophaga* eggs and on the finding of small eggs of *Mallophaga* glued on larger eggs. The two latter observations have never been reported in the literature. The three findings are demonstrated by photographs.

BIBLIOGRAPHIA

THOMPSON, G. B. (1936): Some new records of the occurrence of *Myialges* spp. (*Acarina*). *Ann. nat. hist.*, X, *18*, 315-319.

THOMPSON, G. B. (1939): Further records of the occurrence of *Myialges* and *Microlichus* (*Acarina*) on mallophaga and Hippoboscidae. *Ann. nat. hist.*, XI, *3*, 285-287.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

CLINICAL ASPECTS AND MANAGEMENT OF AMEBIASIS

ERNEST CARROLL FAUST (*)

WHAT IS AMEBIASIS?

Before considering the clinical aspects of amebiasis it will be helpful to define the term «amebiasis». To the parasitologist it means infection of any susceptible animal with any species of parasitic ameba. Natural infections with amebas occur in the cockroach, in turtles, snakes and lizards, monkeys, swine, guinea pigs, dogs and man. In its more restricted application, the medical parasitologist and the physician consider amebiasis to be human infection with *Endamoeba histolytica*, the only ameba capable of invading human tissue. Only one other ameba, *Endamoeba invadens* of reptiles, is known to possess this characteristic of tissue invasion.

The older concept of clinical amebiasis, namely as manifested by dysentery or liver abscess, has been greatly broadened, so that today a widely accepted classification recognizes several categories of intestinal and extra-intestinal infection, *viz*.

A. *Intestinal Amebiasis.*
   1. Acute or chronic amebic dysentery or diarrhea.
   2. Appendiceal syndrome.
   3. Asyndromic infection.
   4. So-called asymptomatic infection.
   5. Complications.

B. *Extra-intestinal Amebiasis.*
   1. Hepatic amebiasis.
      a. Amebic hepatitis
      b. Amebic liver abscess.
   2. Amebiasis of other viscera.
   3. Amebiasis cutis.

(*) *The William Vincent Professor of Tropical Diseases and Hygiene, and Head of the Division of Parasitology, The Tulane University of Louisiana, New Orleans, Louisiana*, U.S.A.

Before taking up each of these items it is desirable to re-state several well-known facts. *First,* human amebiasis is contracted from viable ripe cysts of *E. histolytica* which get into the mouth as a contamination of water, food or otherwise, are swallowed, hatch in the middle or lower levels of the ileum and release minute active amebas. These pass down in the fecal stream into the cecal area and, if their number is sufficient, some of them may lodge in the glandular crypts, feed and begin to multiply.

In the second place, while some of these primary colonies may become established in the colon or rectum, a majority have first chance to develop in the cecum, appendix and ascending colon. This statement is substantiated both by clinical and necropsy findings.

In the third place, the amebas may temporarily develop in the crypts without invasion of the mucosa; these are the so-called « lumen parasites »; but secretion of their lytic enzymes frequently enables them to digest a way into the epithelial cells, from which they derive more substantial nourishment. This process of lytic necrosis may be very superficial or, perhaps more characteristically, individual colonies may penetrate in minute columns to the base of the mucosa, with undamaged tissue between discrete sites of invasion. In case the amebas get through the muscularis mucosae, they spread out radially through the submucosa, so that the fully developed uncomplicated lesion has a neck-like site of entry and an enlarged base.

Fourthly, some of the progeny of the original colonizers in the submucosa frequently erode a pathway into mesenteric venules or lymphatics, to be carried to the liver, lungs, brain and other extra-intestinal organs, where opportunity may be provided for them to set up secondary colonies. Moreover, many of the progeny of the earliest colonizers in the large bowel are extruded from the lesions into the lumen, are carried down to lower levels, or occasionally may be regurgitated into the proximal segment of the ileum, to develop secondary lesions at these levels.

Finally, E. histolytica in the test tube and in the lumen of the intestine is dependent on associated enteric bacteria for its existence, but once tissue penetration has occurred the digested tissue juices provide the essentials for growth, so that amebas deep in the intestinal wall or in extra-intestinal viscera are often free of associated bacteria. However, amebic ulceration of the bowel wall may be superimposed on bacteria lesions, while older amebic ulcers are characteristically invaded by bacteria. These complications modify the pathologic, and hence the clinical picture appreciably.

Thus, the histopathology of the amebic lesion, uncomplicated by bacterial infection, is essentially one of lytic necrosis, whether it is in the bowel wall or in extra-intestinal foci, with very little tissue reaction.

The Extra-intestinal Lesion. - The most common site for colonization of the amebas outside the intestinal tract is the liver, and the usual primary

colony in the bowel from which this secondary colony is derived is located at the cecal level. Both human and experimental evidence demonstrate, that once the amebas have penetrated below the muscularis mucosae, they commonly erode the walls of the mesenteric venules, enter these blood vessels and are carried into the intra-hepatic portal blood. A majority of these organisms apparently fail to colonize and produce no tissue damage. However, if thrombi of fibrinous filaments and leukocytes develop in the smaller branches of the portal vein, and particularly the interlobular venules, the incoming amebas may be trapped long enough to produce lytic necrosis of the walls of these vessels, so that some of the amebas work their way into periportal sinusoids and extend necrotic pathways into the lobule, at times involving the central or collecting vein. At first there is no inflammatory reaction, but as the amebas multiply and necrosis of the tissues progresses, neutrophilic leukocytes infiltrate in numbers into the site. The early colonization in the liver may be single or multiple. This is the pathologic basis for *amebic hepatitis*. It may be soon terminated, may be relatively silent for months or years, or in one or more foci may proceed to *amebic liver abscess* formation. But it must be remembered that the abscess is invariably an advanced stage of the small early implantations.

Pleuropulmonary amebiasis is usually an extension of the hepatic lesion through the diaphragm, although the amebas may be carried from the primary bowel lesion *via* the mesenteric lymphatics of blood vessels without evident liver involvement. *Cerebral amebiasis* may develop subsequent to, or without hepatic amebiasis. Most cases of *amebiasis cutis* involve the perineal skin but some result from rupture of an extra-intestinal abscess through the body wall.

What should be the clinician's attitude concerning amebiasis?

First of all, the clinician should have a profound respect for present or future disease potentialities of *Endamoeba histolytica*. He should be «ameba conscious». By this term I do not mean that he should attribute all of his patient's symptoms to this ameba, proven or suspected to be lurking in the tissues. And he should discourage «amebophobia» in his patients.

The clinical diagnosis should always be supported by demonstration of the organism itself, in the *active trophozoite stage in unformed stools, proctoscopic or cutaneous scrapings, and aspirates* from various viscera, or in the *cystic stage in formed feces*, and clearly differentiated from other intestinal protozoa. Dependable diagnosis requires the close cooperation of the physician with a skilled, experienced clinical laboratory worker, who must be provided with the proper type of fresh specimens for examination. So-called «cysts» obtained from proctoscopic material are almost invariably rounded-up tissue cells and not amebas.

Once a dependable positive laboratory diagnosis has been made, it is the responsibility of the attending physician to evaluate the findings in the light of the patient's history, the physical findings and the symptoms, keeping in mind the well-known fact that the manifestations of amebiasis vary from fulminating colitis or rapidly developing extra-intestinal abscess to asyndromic or apparently asymptomatic state. Is the amebic infection the essential cause of the symptoms? Is it contributory? Or is it incidental? This must be determined by the clinician and not the laboratory diagnostician. However, it will be remembered that a majority of persons with amebic infection have considerable amebic ulceration of the cecum, appendix or colon without serious manifestations, and that a majority of persons with amebic liver abscess had no antecedent history of colitis.

The conclusion which must be reached is that no positive diagnoses of amebiasis in person under the physician's care should be ignored, irrespective of whether they appear to be symptomatic or asymptomic at the particular time. The essential corollary is that all such cases should be given anti-amebic treatment until they are freed of the infection.

ANTI-AMEBIC THERAPY

This consists of three types of treatment, *viz.,* (1) palliative and supportive for patients with acute amebiasis; (2) chemotherapeusis directed against the amebic trophozoites in the tissues, and (3) measures directed against bacteria which have complicated the amebic lesions.

(1). *Palliative and Supportive Measures.* These are to relieve severe symptoms, including those resulting from excessive bowel movements. Opium may be administered to reduce peristalsis. Emetine hydrochloride is helpful to control discomfort due to excessive amebic erosion of the bowel wall or invasion of other tissues, but its cure rate is *not* more than 20 per cent for amebic colitis. As a palliative measure in intestinal amebiasis it should never be employed for more than 5 or 6 days, administering no more than one mg. per kilo body weight each 24 hours and never in excess of 65 mg. daily.

(2). *Direct Anti-Amebic Treatment.* - Today, in contrast to 30 years ago, there are several chemically-different groups of therapeutics which have a high cure rate in amebic infections. For intestinal amebiasis these include:

(a) The *halogenated hydroxyquinolines*, such as diodoquin, chiniofon and vioform.

(b) The *arsenic acid derivatives*, such as carborsone, thioarsenites and bismuth glycoarsanilate (Milibis).

(c) *Certain antibiotics*, such as chlorotetracycline (Aureomycin), bacitracin, oxytetracycline (Terramycin) and Fumagillin. Of these Terramycin and Fumagillin apparently have the greatest amebicidal potency.

For amebiasis of the liver and other extra-intestinal viscera the 4-hydroxyquinoline, chloroquine, has been found to be as effective as emetine hydrochloride, the older standard chemotherapeutic employed for this purpose, and chloroquine is very much safer.

My own present-day preferences among these several agents is diodoquin or carbarsone for non-dysenteric or non-diarrheic amebic colitis, Terramycin or Fumagillin for the more fulminating types of colitis, and chloroquine for extra-intestinal infection. In the latter type of the disease it is essential that concurrent chemotherapy for amebic colitis be administered, to safeguard against potential new colonization of the ameba in extra-intestinal sites, as well as amebic colitis of clinical grade.

(3). *Treatment for Amebiasis Complicated by Bacterial Infection.* In chronic amebic colitis the amebic ulcer is almost invariably invaded by bacteria, so that drugs effective earlier in the infection are frequently not curative in the chronic infection. In these cases use of certain antibiotics, either as a preliminary procedure or administered simultaneously with the specific anti-amebic drug, help to eradicate the infection in the bowell. Penicillin was first found to have this effect, more recently Aureomycin and Terramycin. Fumagillin has a very narrow spectrum of activity, almost solely as an anti-amebic drug, and its most enthusiastic proponents do not recommend it for this two-fold purpose.

In case there is evidence of bacterial contamination in extra-intestinal sites of amebiasis, anti-bacterial therapy, administered systemically or introduced directly into the lesion, is advised in conjunction with drainage of the lesion and specific therapy. In this connection high praise is due Doctor ALTON OCHSNER and his associates for their conservative handling of surgical cases of amebiasis.

PROGNOSIS

The present-day armamentarium of anti-amebic drugs provides at least 90 per cent cures, provided the amebic infection is discovered early and managed properly. At times courses of treatment with several of the most useful drugs may be needed, one following the other, to eliminate the ameba. If several such courses of treatment do not bring symptomatic relief and produce cure, then some other etiology for the difficulty should be suspected. However, in amebic colitis of long standing the infection may be eradicated but normal function of the bowel may not be achieved.

Public health aspects of amebiasis

Therapeutic Prophylaxis. Several years ago the late Colonel CHARLES F. CRAIG suggested that diodoquin might be valuable as a prophylactic drug to to be taken by persons who were subject to exposure in highly endemic areas of amebiasis. Although the idea was practical, no controlled clinical tests have ever been made of this proposal. On the other hand, investigators in mental hospitals (BERBERIAN et al., SODEMAN and BEAVER) and currently in a state prison (BEAVER and JUNG) have demonstrated the protective value of bismuth glycoarsanilate (Milibis), when taken prophylactically, and HOEKENGA has shown the prophylactic usefulness of Milibis in combination with chloroquine in a tropical community where both amebiasis and malaria are highly endemic. Thus, the value of anti-amebic prophylaxis with this drug appears to be adequately supported by clinical tests.

Incidence of Amebiasis. The incidence of human infection with *Endamoeba histolytica* is typically higher in tropical areas and in institutionalized groups in all parts of the world than it is in the general population of temperate climates. This is due to differences in environmental conditions and personal hygiene which favor or restrict exposure. Natives in highly endemic communities seem to develop considerable tolerance to amebic infection, although this may be more apparent than real.

In New Orleans 20 years ago the patients on the obstetric services of Charity Hospital had an average infection of 10 per cent and Tulane medical students, of 8 per cent. Today the incidence figures for comparable groups are about 2 per cent and considerably less than one per cent respectively. A similar decline has been demonstrated in the Los Angeles, California area. The reason for these reductions is not known. Improved hygienic conditions in the United States may have contributed to the decline but can hardly be solely responsible. Is it possible that the general use of penicillin and more recently of Aureomycin have played a part in this improved situation?

SUMMARY

Amebiasis is infection of any host with any species of ameba. Clinically, the term is restricted to human infection with *Endamoeba histolytica*, whether the condition is symptomatic, asyndromic or asymptomatic. Amebiasis results from swallowing cysts of this organism, which excyst in the small intestine and colonize in the crypts or wall of the large intestine. Secondly, colonies later develop at other levels of the large intestine and at times in various extra-intestinal sites. Metabolic needs of the ameba in the intestinal lumen are provided by certain enteric bacteria; but once the ameba has penetrated into the tissues the lysed host cells meet this requirement.

Clinical suspicion of amebiasis should be confirmed by laboratory demonstration of the ameba. All persons diagnosed as positive, irrespective of their state of health,

should be treated until cured. In acute infections appropriate measures should be instituted to alleviate symptoms. For specific therapy a large number of good drugs are available, viz., halogenated hydroxyquinolines arsonic acid derivatives, certain antibiotics, chloroquine and emetine hydrochloride. In chronic cases anti-bacterial agents should be used as supplements. In certain population groups chemotherapeutic prophylaxis offers considerable promise both to the individual and to the community.

RIASSUNTO

Deve intendersi per amebiasi l'infezione di qualsiasi ospite da parte di qualsiasi specie di ameba. Clinicamente, il termine è limitato all'infezione umana da *E. histolytica*, sia che si presenti sintomatica che asindromica o asintomatica. L'amebiasi origina dall'ingestione di cisti dell'ameba che schiudono nel tenue. Le amebe si moltiplicano nelle cripte o nelle pareti del crasso.

Colonie secondarie si sviluppano in seguito a livelli diversi del crasso ed a volte in varie sedi extra-intestinali. Le esigenze metaboliche dell'ameba nel lume intestinale sono soddisfatte da alcuni batteri enterici; ma una volta che l'ameba è penetrata nei tessuti, le cellule lisate dell'ospite provvedono al suo nutrimento.

Il sospetto clinico di amebiasi dovrebbe essere confermato in laboratorio dalla dimostrazione dell'ameba. Tutte le persone diagnosticate come positive, senza tener conto del loro stato di salute, dovrebbero essere trattate fino a guarigione. Nelle infezioni acute, dovrebbero essere prese misure speciali onde alleviare i sintomi. Un gran numero di buoni medicamenti sono disponibili per la terapia specifica, p. es., idrossichinoline alogenate, derivati dell'acido arsonico, alcuni antibiotici, clorochina e cloridrato di emetina. Nei casi cronici, sostanze antibatteriche dovrebbero essere usate come coadiuvanti. In alcuni gruppi di popolazioni la profilassi chemoterapeutica offre prospettive favorevoli sia per l'individuo che per la comunità.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

L'EOSINOPHILIE DANS LES FILARIOSES

HENRI GALLIARD (*)

Les différentes filaires, comme tous les helminthes, et en particulier les nématodes, déterminent par les produits de leur métabolisme, l'apparition d'une éosinophilie importante, locale autour du parasite et générale dans le sang circulant.

Cette éosinophilie est précoce et ce fait permet d'attirer l'attention alors que le diagnostic de certitude n'est pas encore possible.

C'est une notion qui existe depuis fort longtemps. Il existe une immense bibliographie. Mais les anciens auteurs ont peu insisté. BILLET (1901), REMLINGER (1902), GULLAND (1903), VAQUEZ et CLERC (1902) l'ont signalé.

Causes de l'éosinophilie. Parmi les nématodes les filaires sont probablement celles qui ont un pouvoir éosinophilogène le plus élevé en raison de l'activité de leur métabolisme. A ce point de vue il est certain que l'élément le plus actif est le ver adulte femelle dont la ponte est remarquablement active. On parle souvent du rôle des microfilaires, mais le métabolisme de ces embryons est extrêmement réduit à cette période de non développement, ainsi que celui des vers mâles.

MONTPELLIER, LACROIX et BOUTIN (1921) étudiant les lésions cutanées chez des noirs porteurs d'onchocerque, constatent une variation du taux oscillant entre 0 et 70%: « Nous n'avons pu rattacher ces variations de la formule sanguine à quelques lois précises. Ces troubles leucocytaires nous ont paru anarchiques... Cependant le maximum de l'éosinophilie s'observe surtout au moment de chaque décharge microfilarienne, c'est à dire au début de la poussée éruptive. Par contre son minimum coincide avec l'apparition des infections microbiennes dues au grattage ».

On reconnaît maintenant que l'éosinophilie sanguine peut augmenter au moment des accidents inflammatoires d'origine anaphylactique, et au moment du traitement par le diéthyl-carbamazine.

(*) *Faculté de Médecine de Paris, Institut de Parasitologie.*

Il semble bien certain que les éosinophiles du sang circulant ne soient pas les mêmes, morphologiquement, que ceux trouvés dans les tissus au voisinage des vers vivants ou morts. La question de savoir s'ils ont la même origine a été souvent discutée.

Nattan-Larrier et Parvu (1909) ont constaté que les plaques d'oedème de Calabar contenaient d'innombrables éosinophiles produits probablement sur place. Comme ils trouvaient 40 à 70% d'éosinophiles dans le sang au moment des oedèmes et 24 à 54% entre temps, ils en concluent que les éosinophiles prennent leur origine dans les oedèmes.

Plusieurs auteurs se sont élevés contre cette conception. Pour Schilling Torgau, elle n'est pas biologiquement fondée.

Fairley observa des oedèmes aigus et un urticaire généralisé au moment de la percée de la peau par un ver de Guinée. L'éosinophilie au moment de l'apparition de l'urticaire était de 3,3% et monta à 15,9% après 48 heures. Fairley en conclut que les éosinophiles du sang circulant se rendent d'abord dans les papules urticarienne, tandis que plus tard les produits irritants du ver excitent la moelle osseuse qui produit de nouveax éosinophiles.

Pour Pautrizel (1948) l'hypothèse selon laquelle l'éosinophilie locale résulte uniquement de l'action éosinotactique de certaines substances sécrétées par les parasites n'est pas confirmée par les faits expérimentaux. On ne peut mettre en évidence aucun appel éosinophilique spécifique, mais il existe chez les helminthes des facteurs chimiques chimiotactiques vis à vis des polynucléaires quels qu'ils soient.

Au cours de l'éosinophilie tissulaire provoquée par les helminthes, une partie des cellules sont formées sur place et résultent, comme dans toute réaction anaphylactique de l'union de l'antigène et des anticorps correspondants.

Les antigènes glucido-lipido-polypeptidiques semblent surtout responsables de la formation in situ des granulations éosinophiles qui peut être d'ailleurs troublée par l'action d'un antihistaminique.

Par ailleurs nous verrons plus loin l'influence de la mort et de la dégénèrescence des filaires adultes et des microfilaires dans les tissus comme causes déterminantes des accidents aigus et de l'infiltration éosinophilique considérable qui surviennent à ce moment.

Rôle des microfilaires. — Nous avons dit que les embryons avaient un metabolisme très réduit, mais certains auteurs ont pensé que les microfilaires jouaient un rôle déterminant dans la variation du nombre des éosinophiles du sang circulant, et ont cherché à le démontrer, dans le cas de *W. bancrofti* et *Loa loa* à microfilarémie périodique, au cours de Nychtémère.

Pour *Wuchereria bancrofti* Gulland avait constaté une augmentation des éosinophiles la nuit (4,5 contre 9,12%), Coles également (15 contre 17%). Par contre Calvert (1902) constate l'inverse: le nombre des éosinophiles est plus

grand quand les microfilaires sont absentes du sang. Dans 2 cas, il trouve 11% le jour contre 6% la nuit et 15% le jour contre 12% la nuit. Mais pour WHYTE il y a un rapport étroit, dans presque tous les cas, entre le taux de microfilarémie et celui des éosinophiles.

En réalité, et les auteurs sont actuellement d'accord (FULLEBORN), la périodicité de la microfilarémie n'intervient aucunement. Les divergences que nous citons sont dues à des différences d'interprétation et aux méthodes de numération des éosinophiles sur frottis désséchés qui n'ont qu'une valeur qualitative et non quantitative.

Il est évident que la numération des éosinophiles faite sur lame conduit à des appréciations erronées, à moins que les chiffres trouvés soient considérablement différents, ce qui n'est pas le cas dans les exemples que nous citons. D'autre part ces auteurs avaient méconnu les variations normales, physiologiques des éosinophiles pendant les 24 heures.

Intensité de l'éosinophilie. — Toutes les filaires de l'homme déterminent une éosinophilie élevée. Cependant les auteurs sont loin d'être d'accord sur les taux. Pour *W. bancrofti,* WURTZ et THIROUX (1905) disent: « on remarque une leucocytose intense avec une éosinophilie pouvant aller jusqu'à 12%. D'après BROCHARD (1910 les auteurs s'accordent à reconnaitre que la filariose s'accompagne d'une éosinophilie qui varie de 7,5 à 70% ».

D'après F. FULLEBORN (1929) le pourcentage moyen d'éosinophiles trouvés par les différents auteurs est de 70 à 75%. REMLINGER k(1902) cite deux cas de chylurie avec 70 et 75%. FULLEBORN rappelle cependant que les chiffres signalés dans certains pays sont beaucoup moins élevés. Il y a une constatation de fait, c'est que le pourcentage d'éosinophiles est surtout élevé chez les individus de race blanche. Les Asiatiques, les Africains présentent des indices beaucoup plus faibles. D'après ROSE (1921) l'éosinophilie est faible en Guyane Britannique; pour BAHR elle est de 12 à 18% dans le Pacifique sud, 14% aux Fidji (1912); pour BROCHARD 18,7% aux iles Wallis (1910).

O'CONNOR aux iles Samoa a observé des taux variables chez les autochtones, atteignant 30%. Dans des infections mixtes avec Ankylostome et Trichocephale il y avait 50% d'éosinophiles. Cependant l'infection mixte ne détermine pas un degré d'éosinophilie plus élevé. Chez les Européens résidant depuis de nombreuses années et souffrant de toutes les manifestations de la filariose et dépourvus de tout parasite intestinal, il a trouvé de 13 à 29%. Deux blancs souffrant de troubles pulmonaires, bronchite et asthme, avaient 39 et 58%. Pour O'CONNOR également le degré d'éosinophilie est sans rapport avec l'intensité de la filariose.

Avec MILLE (1949) nous avons trouvé à Tahiti un indice allant de 8 à 25%. Ont voit également dans le tableau qu'il n'y a aucun rapport entre le degré de microfilarémie et celui de l'éosinophilie.

Il est curieux de constater que chez les marines des U.S.A. ayant contracté la filariose dans le Pacifique Sud, l'éosinophilie était modérée. WARTMAN (1948) signale des moyennes de 9.000 leucocytes et 850 éosinophiles par mm^3 (9,4%). GOODMAN et Collab. (1945) ont trouvé 4 à 10% d'éosinophiles dans la majorité des examens.

En Chine, WHITE (1909), dans la province de Canton, considère que 97% des individus ont des parasites intestinaux et présentent une éosinophilie de plus de 10%. Lorsque la filariose est surajoutée, le taux peut atteindre 23%. D'après lui le taux serait proportionnel au degré de filarémie, ce qui ne ressort pas d'ailleurs des tableaux annexés à ce travail.

Au Tonkin en 1936, nous avons étudié l'éosinophilie chez les Tonkinois porteurs de lésions filariennes. La moyenne du taux des éosinophiles est de 5%. Le maximum trouvé a été 32%, et le minimum 2%. Le degré d'éosinophilie n'a pas de rapport avec le nombre des microfilaires, ni avec la nature ou la gravité des signes cliniques. Il fut de 32% dans un cas de chylurie, de 26 et 22% dans deux cas d'hématochylurie, ou bien de 10 à 2% dans des cas de chylurie, d'hydrocèle ou d'orchivaginalite aigüe. La plus forte éosinophilie trouvée chez des porteurs de microfilaires apparemment sains fut de 20%.

Le cas de *W. malayi* est des plus intéressants. Les auteurs qui l'ont étudié en Extrême Orient n'avaient pas trouvé indices d'éosinophilie différents de ceux déterminés par *W. bancrofti*. Nous mêmes avons trouvé au Tonkin des indices variant de 6 à 23%. Nous n'avions jamais observé cette filariose, non plus que *W. bancrofti* d'ailleurs, chez des individus de race blanche.

Cependant MEYERS et KOUWENAAR (1939) trouvent des chiffres élevés chez six Javanais atteints de filariose ganglionnaire: 32 à 77%. Chez l'un d'eux, elle varie largement entre 13 et 65%. Chez un septiéme, enfin elle n'est que de 11%.

Récemment chez des soldats rapatriés d'Indocine, Français ou Africains du Nord, FRIESS, PIERROU et SEGALEN observant un taux d'éosinophilie extrêmement élevé, ont pu mettre en évidence dans les ganglins la microfilaire de *W. malayi*.

Il y avait chez ces malades hyperleucocytose (20.000 globules par mm^3, au plus 77.400) et hypéréosinophilie. Le pourcentage fut de 85% dans un cas, le chiffre absolu maximum observé fut de 61.900 per mm^3. Ces auteurs notèrent également que cette hypéréosinophilie n'était pas en rapport avec le volume des adénopathies ni l'importance des phénomènes bronchiques.

Les éosinophiles étaient extrèmement abondants dans les ganglions là où l'on retrouvait des microfilaires en voie de dégénérescence, même lorsque l'éosinophilie sanguine était faible (8 à 10%).

Il est à noter également la persistance de l'éosinophilie chez des malades laissés sans traitement: 61% et 26.200 leucocytes six mois après le repatriement.

Loa loa. — L'éosinophilie est précoce et s'élève considérablement au moment de l'apparition des premiers oedèmes de Calabar. Elle est aussi très élevée chez les blancs. Elle atteint 75 à 80%, mais elle est parfois inférieure. Nous avons récemment observé un cas où le nombre total atteignait 4268 (30%).

Connal (1912) trouve 7,2 à 19,2% en moyenne 12,8% chez les autochtones Marotte et Morvan (1924) observent que sur 113 sénégalais porteurs de microfilaires de *Loa loa* et *F. perstans*, une éosinophilie nette n'a été observée que dans un cas de filariose oculaire.

Au Gabon (1930), nous avons recherché si l'étude de l'éosinophilie pouvait donner des indications utiles. *Filaria perstans* n'intervient pas, mais l'ankylostomose est ici comme ailleurs certainement un des principaux facteurs déterminants de l'éosinophilie. Notons que l'éosinophilie est inversement proportionnelle à l'ancienneté de l'infestation et à la gravité de l'anémie (Boycott, 1905). Nos examens ont porté sur 300 frottis de sang effectués dans des localités diverses de la forêt et de la savane. Ils comprennent 20 enfants de moins de 5 ans, 100 de 5 à 12 ans, 160 adultes et 20 individus âgés. Les résultats généraux ont été les suivants:

	F. perstans	*L.loa*	*Eosinophilie*
Pourcentage général			30 p. 100
Enfants 0 à 5 ans . . .	10 p. 100	0 p. 100	11 »
Enfants 5 à 15 ans . . .	31 »	5,7 »	31 »
Au-dessus de 15 ans . . .	47.5 »	15,4 »	48 »
Individus âgés	20 »	0 »	30 »

Il semble qu'il y ait un certain parallélisme entre le pourcentage des porteurs de microfilaires de *Loa loa* et l'éosinophilie qui a tendance à augmenter progressivement jusqu'à l'âge adulte pour régresser ensuite. En réalité, il y a des variations locales et individuelles considérables. Ainsi le maximum trouvé a été 55% chez un blanc, 56% chez un enfant noir, le minimum 12% chez un noir adulte.

On voit aussi que le taux d'infestation par *Loa loa* est très faible chez les individus âges. Cependant le taux de l'éosinophilie reste chez eux assez élevé.

L'éosinophilie n'est pas obligatoirement proportionnelle au degré probable d'infestation.. Ainsi nous avons pu observer une famille de blancs, père, mère et enfant de 12 ans, arrivés ensemble en Afrique Equatoriale présentant à peu près le même nombre de microfilaires dans le sang. Le nombre des éosinophiles atteignait 54 et 55% chez le père et la mère, (seule elle présentait des accidents cliniques) et 18% chez l'enfant, et pourtant les chances d'infestation étaient au moins égales pour la mère et l'enfant.

On constate d'autre part que les individus présentant uniquement des microfilaires de *Filaria perstans*, ont communément 40% d'éosinophiles. Il s'agit vraisemblement d'une infection mixte par les deux filaires.

Le taux de l'éosinophilie n'a aucune relation avec l'importance de la mi-

crofilarémie. Elle peut être considérable et cependant le pourcentage des éosinophiles peut ne pas dépasser 15% chez un adulte.

L'existence d'accidents cliniques plus ou moins graves dus à la présence de *Loa-loa* n'a aucun rapport avec la microfilarémie (*). C'est un fait d'observation courante qui a été signalé par de nombreux auteurs, en particulier chez les blancs. Il semble qu'il en soit de même chez les autochtones. Sur 30 individus présentant des oedèmes des membres, des mains ou des filaires sous-conjonctivales, 3 présentaint de nombreuses microfilaires; chez 3 autres, elles étaient très difficiles à trouver. Chez les 24 autres, il n'y en avait aucune. On dirait même que dans certains cas, les accidents sont d'autant plus intenses que le degré du parasitisme semble plus faible.

L'éosinophilie est certainement plus en rapport direct avec l'intensité des accidents qu'avec le nombre des microfilaires, mais non pas d'une façon générale et absolue. Nous l'avons vu varier chez ces malades entre 28 et 55%. Billet (1901), Nattan-Larrier et Parvu (1909) ont observé une augmentation du pourcentage au moment de l'apparition des oedèmes. Celà s'est produit dans certains cas seulement en ce qui concerne nos malades; chez les noirs, l'augmentation nous a paru toujours assez faible et n'a jamais dépassé 13%. Il n'y a pas toujours retour à la formule antérieure apres disparition des accidents. Ainsi nous avons pu suivre deux malades qui présentèrent respectivement deux ou trois poussées inflammatoires à quelques semaines de distance. Le nombre des éosinophiles augmenta chaque fois de façon notable et définitive.

En résumé, l'examen du sang chez les indigènes du Gabon montre dans l'ensemble un certain parallélisme entre le taux de l'éosinophilie et le degré d'infestation par *Loa-loa,* du moins tel qu'il est révélé par le nombre des microfilaires du sang périphérique, avec un maximum chez l'adulte et une régression marquée chez les individus âgés. Cependant les variations individuelles sont très importantes.

L'éosinophilie ne semble pas de façon absolue en rapport avec l'intensité des signes cliniques; en particulier le taux le plus élevé a été observé chez un individu n'ayant jamais présenté aucun accident.

Ainsi chez des individus placés dans des conditions absolument semblables, semblant avoir le même degré d'infestation, le pourcentage des éosinophiles présente des écarts considérables; il peut être identique chez des individus ayant les uns des accidents cliniques très marqués, le autres en étant absolument indemnes.

Nous avons confirmé récemment (1954) cette différence entre blancs et noirs comme on peut le voir dans le tableau II. Chez les noirs l'éosinophilie ne dépasse pas 15%, et peutêtre aussi faible que 3%. En valeur absolue plus de 3.000 éosinophiles chez les blancs et toujours moins de 1.200 chez le noirs.

(*) Billet (1901) a constaté la disparition des éosinophiles au cours des accès paludéens et leur réapparition aussitôt après.

Eosinophilie et éléphantiasis. — Les partisans et adversaires de l'étiologie filarienne de l'éléphantiasis ont cherché à tirer argument de la présence ou l'absence d'éosinophilie chez les malades.

Pour Tribondeau à Tahiti, « dans la filariose simple sans éléphantiasis, il y a une éosinophilie considérable qui peut atteindre 70%. Or, dans l'éléphantiasis sans filariose, ce nombre est à peu près normal 0,75%.

Brochard, de ses études aux Iles Wallis (Polynésie) tire des conclusions différentes: 1°) Le taux de l'éosinophilie dans l'éléphantiasis avec filariose est de 14,5% en moyenne, alors qu'il est de 18,7% en moyenne dans la filariose sans éléphantiasis. 2°) Il est de 13% dans l'éléphantiasis non accompagné de filariose (absence de microfilarémie). 3°) Enfin l'éosinophilie se montre indépendante du nombre des microfilaires, de l'âge ou de la gravité des lesions pachydermiques.

Les diffénces sont donc insignifiantes. C'est évidemment ce que l'on constate dans des régions, comme la Polynésie, où la proportion des filariens et des éléphantiasiques est également élevée. Le taux de l'éosiniphilie dépend de « l'activité » de la filariose. Mais dans les pays où la filariose et l'éléphantiasis sont sporadiques on pourra épiloguer éperdumment. L'éléphantiasis,à un certain degré de développement, atteint un état stable, définitif. Les crises de lymphangite cessent, les microfilaires disparaissent parfois et l'éosinophilie régresse à condition que l'individu ne soit pas constamment surinfesté. L'intradermo-réaction, elle-même peut donner à ce moment un résultat négatif. Et l'on en tirera la conclusion, un peu hâtivement, que l'individu n'est pas filarié.

Causes de la variation des indices dans le monde: Rôle des associations parasitaire. Ainsi les résultats du pourcentage ou du nombre absolu des éosinophiles est variable dans les différentes régions du monde.

Les blancs sont les plus sensibles. Nous avons dit que l'infestation par *W. malayi* chez les Africains du Nord infestés au Tonkin provoque également une éosinophilie considérable, alors que chez les autochtones des pays d'Extrême-Asie le taux, comme nous l'avons constaté nous-mêmes avec d'autres, est assez modéré et ne diffère pas de ce que l'on trouve pour *W. bancrofti*.

On a souvent soutenu l'hypothèse que dans les pays tropicaux, le polyparasitisme était la règle. Si pour Duncan Whyte l'éosinophilie est d'autant plus élevée que le nombre des espèces est plus grand, Lee-Lu Hung par contre note qu'avec deux espèces, par exemple le taux est plus faible qu'avec une seule. En somme « l'accoutumance au facteur éosinophilogène » apparent par exemple pour une ankylostomose ou une distomatose resterait valable pour une autre espèce.

Pour ce qui est des filarioses, nous nous inscrivons en taux contre une pareille affirmation. Si les taux d'éosinophilie sont plus faibles dans certains pays, c'est qu'il s'agit certainement d'une question raciale. Nous avons vu

dans ces différents pays du monde des filarioses chez des individus dépourvus de tout autre parasitisme: le taux de l'éosinophilie n'avait aucun rapport avec ce fait.

Notons que SEGALEN (1953) rapporte l'observation d'Africains du Nord qui avaient 70 à 78% d'éosinophiles et qui, en plus de *W. malayi,* hébergeait des ascaris, des ankylostomes et des trichocéphales. Il n'y avait donc chez eux aucune accoutumance. Ils furent traités par le diéthyl carbamazine et le taux d'éosinophilie tomba alors à 30%. On pourrait dire que ce taux irréductible était dû à la persistance du parasitisme intestinal. Mais dans un autre cas le taux d'éosinophiles était de 60% et le parasitisme identique à celui du cas précédent. Or le traitement fit tomber le taux à 1%. Ce qui prouve qu'il est bien difficile en cette matière de formuler des lois.

On peut évidemment, pour expliquer une éosinophilie faible, faire intervenir certains facteurs extrinsèques comme le jéune, l'état de carence, la cachexie. Mais dans le cas de *Loa loa,* on voit sur le tableau II que les Africains noirs vivant à Paris dans d'excellentes conditions et déparasités dans toute la mesure du possible, présentaient toujours des indices très faibles par rapport aux blancs.

Persistance de l'éosinophilie. — A ce point de vue on pourrait dire que la question de l'intensité de l'éosinophilie que nous avons soulevée plus haut n'est pas une question raciale, mais que c'est plutôt l'ancienneté de l'infestation qui interviendrait.

Or dans les filarioses il est bien connu que l'on observe des taux d'éosinophilie très élevée pendant des années. REMLINGER (1902), au Caire, rapporte les cas de deux individus, l'un chylurique depuis 5 ans, l'autre depuis 25 ans, présentant respectivement 70 et 75% d'éosinophiles.

Ce fait est courant. Nous avons suivi une infestation à *W. bancrofti* d'origine tonkinoise pendant des mois. L'éosinophilie n'a jamais varié. Un autre individu d'origine Antillaise, chylurique depuis 10 ans présentait un taux de 65%.

MEYERS et KOUWENAAR (1939) chez leurs malades, ont constaté une persistance de l'éosinophilie à un taux très élevé: 63 à 70% pendant 2 ans, 38 à 52% pendant 3 ans, 32 à 63% pendant 2 ans. Un des malades ne présenta pas plus de 11% pendant cinq ans.

SEGALEN cite le cas de deux malades à *W. malayi* qui laissés sans traitement conservèrent le même taux d'éosinophilie six mois et un an après leur repatriement.

Dans un cas récent de *Loa-loa* nous avons constaté (1954) un taux d'éosinophilie de 30% (5.700 par mm³) chez une femme ayant vécu 7 ans en Oubangui-Chari.

Au reste G. LAVIER qui a particulièrement insisté sur le facteur chronologique dans l'appréciation de l'importance de l'éosinophilie d'origine parasitaire, dit à propos des filarioses. « Dans ces affections extremement chroniques, des

chiffres élevés ont été souvent notés, alors que l'infestation était manifestement ancienne ». Ce fait échappe donc aux « lois » de l'éosinophilie d'origine parasitaire. G. Lavier interprète celà soit par une chute particulièrement lente du taux, soit par une réactivation tardive du processus. Par ailleurs cet auteur niant que l'éosinophilie soit un phénomene d'ordre anaphylactique, estime cependant que ces troubles peuvent perturber la marche normale de l'éosinophilie et « c'est peut-être une explication de la haute éosinophilie accompagnant les poussées aigûes de la filariose ».

Cependant le probleme reste entier. Si en effet on observe parfois une exacerbation de l'éosinophilie au cours d'accidents aigus, il faut noter que dans l'intervalle des crises le taux reste toujours très élevé.

Encore une fois les filarioses échappent à la règle commune, comme *Strongyloides stercoralis*. Mais dans ce dernier cas l'explication est plus facile à fournir.

Eosinophilie dans les tissus et les lésions d'origine filarienne — Les éosinophiles sous forme d'histiocytes sont rarement visible dans les lésions anciennes. Avec P. Huard (1948) nous n'avons constaté dans des biopsies ou pièces opératoires, au Tonkin que tout à fait exceptionnellement leur présence dans des cas d'épididymite et d'orchite chroniques ou aigu, ou dans les lymphatiques du rein.

O'Connor et Hulse (1932), chez un malade qui n'avait ni microfilaires, et 1% d'éosinophiles, a trouvé de nombreuses filaires adultes vivantes ou mortes. Ils constatent qu'autour du ver vivant l'infiltration cellulaire des parois lymphatiques est faible. Il existe au contraire une réaction inflammatoire sèvère et massive autour des vers morts et en voie de désintégration. Il se forme une zone de nécrose, de calcification, autour de lequel on trouve des fibres de collagène et une intense infiltration leucocytaire. A la péripherie enfin on trouve des éosinophiles en quantité énorme. Plus tard le tissu fibreux s'organise à la place du thrombus et les éosinophiles tendent à disparaitre.

Meyers et Kouwenaar ont signalé l'existence de véritables abcès éosinophiliques dans les ganglions dûs à la presence de microfilaires. Les cas étaient associés à une éosinophilie importante du sang et 2 fois à des crises d'asthme bronchique.

C. Bonne (1939) a observé, dans un cas d'autopsie d'un Javanais tué accidentellement, la présence de microfilaires exclusivement dans la rate qui avait réagi par une infiltration extraordinaire d'éosinophiles.

Hartz (1914) a constaté aussi que dans les tissus lymphatiques les éosinophiles sont absents ou rares si les vers sont vivants, mais quand ils étaient morts quelque temps avant l'opération, l'éosinophilie était considérable. Dans un cas d'épididymite aigu il trouva des filaires nécrosées et d'énormes amas d'éosinophiles. L'absence de tout granulocytes démontrait qu'aucun processus

infectieux n'intervenait dans l'inflammation. Plus tard (1950), HARTZ décrit un cas d'orchite aigu. Des infiltrats étaient constitués par un mélange de lymphocytes et d'éosinophiles, mais la plupart, surtout les plus grands, étaient presqu'exclusivement composés d'éosinophiles. Ils étaient également abondants avec les cellules plasmatiques dans le tissu interstitiel oedémateux des lobuli, dans les vaisseaux lymphatiques, et infiltrés sous l'endothélium dans les parois veineuses. Dans les infiltrats les tubes séminifères étaient envahis et détruits; seules les cellules interstitielles avaient résisté aux éosinophiles. Des infiltrats périvasculaires existaient dans l'albuginée, dans le corps de Highmore et le testicule. Nul part il ne fut trouvé de granulocytes. Les infiltrats, la phlébite éosinophilique existaient aussi dans l'épididyme et le cordon. Ainsi à ce stade la lésion majeure était l'infiltrat éosinophilique du testicule avec destruction des tubes séminifères.

L'auteur insiste sur la surprenante bénignité des lésions produites par les vers vivants, avec rareté ou absence complète d'éosinophiles. Qand le ver dégénère, une réaction éosinophilique marquée peut se superposer au processus granulomateux, on peut même constituer la seule lésion, même lorsque cliniquement il y a inflammation suraigue. Il peut y avoir nécrose, mais alors les éosinophiles sont rares. Dans d'autres cas, les lésions exsudatives prédominent et il y a de vastes infiltrats d'éosinophiles et même des « abcès éosinophiliques ».

L'auteur insiste sur le fait que cette association constatée entre le ver dégénéré et la réaction éosinophilique montre l'existence d'une réaction allergique chez ces malades hypersensibilisés. WARTMANN fait observer qu'il n'y a pas de modifications cellulaires spécifiques de l'hypersensibilité qui est certainement un facteur important de la pathogénie des lésions de la filariose à ce stade.

Pour WARTMANN (1944) une lésion initiale commune est l'épaississement et l'hyperplasie de l'endothélium des lymphatiques avec infiltration et exsudation périvasculaire des éosinophiles. L'hyperplasie est donc la règle. L'infiltration des éosinophiles est la principale réaction de l'inflammation, les autres cellules sont en nombre infime. Pour l'auteur ces éosinophiles sont la plupart d'origine sanguine, mais certains sont de vrais histiocytes formés sur place au dépens du tissu réticulaire. Enfin cette inflammation n'a rien de commun avec un processus infectieux.

Mais ailleurs WARTMANN en 1947 écrit: dans le cas des vers adultes, il y a précipitation de substances acidophiles autour des vers, avec nécrose des tissus, infiltration d'éosinophiles. Dans le cas des microfilaires il n'y a pas de nécrose, et le précipité quand il existe est amphotère.

D'après THOMSON, RIFKIN et ZARROW (1945) l'examen du ganglion montre à la phase aigüe une hyperplasie des follicules lymphatique, une infiltration éosinophilique et de l'oedème. Parfois on ne trouve aucun parasite.

Les lymphatiques de la région enflammée ont un paroi epaissie avec oedème et infiltration d'éosinophiles. La lumière du vaisseau est occupée par

un thrombus d'éosinophiles agrégés et nécrosés. On y trouve aussi parfois des vers ou segments de vers. Les lymphatiques superficiels révélent le caractère généralisé de l'infection par l'infiltration de leur paroi par les éosinophiles.

Plus tard à la phase subaigue, c'est une reaction leucocytaire granuleuse et proliférante, envahissant la lumière et les parois du vaisseau d'une part et le tissu conjonctif périphérique. Dans les ganglions on observe parfois un vrai granulome tuberculoide. A la phase chronique la fibrose envahit les vaisseaux qui prennent l'aspect de cordon fibreux.

Hartz, Van den Saar (1948) ont trouvé dans des ganglions avec des microcrofilaires désintégrées, l'aspect typique de l'éosinophilie tropicale. Macroscopiquement les ganglions présentaient des plaques jaunâtres qui étaient des zones d'infiltration par les éosinophiles siègeant dans le cortex et la zone médullaire. Les éosinophiles étaient nombreux dans les vaisseaux. Dans les infiltrats d'éosinophiles des microfilaires typiques furent trouvées.

Ces mêmes auteurs avaient déjà constaté (1945-46), ces infiltrations dans une épididymo-funiculite, avec des microfilaires en voie de nécrose. Ils sont encore d'avis qu'il s'agit d'un phénomène non spécifique, allergique chez un individu sensibilisé.

Reisel et Groen (1951) ont trouvé *Microfilaria malayi* dans un ganglion, dans un cas d'éosinophilie tropicale, originaire de Sumatra.

Winckel et Fross (1953) ont vu dans un ganglion un nombre énorme de microfilaires vivantes accumulées et entourées de tissus nécrotiques, mais sans éosinophiles en ce point. Mais ils ont constaté aussi la relation entre la présence du ver adulte morte et la réaction éosinophilique.

Friess, Pierrou et Segalen (1953) ont retrouvé également dans le cas de *W. malayi* l'aspect typique du ganglion. Dans les centres germinatifs les éosinophiles sont en petit nombre. L'infiltration éosinophilique est plus importante dans les plages lymphoides périphériques. Les éosinophiles forment quelquefois des plages de grande étendue, « en culture pure » disent les auteurs. Ces plages correspondent aux points jaunes vus à l'examen macroscopique. C'est au sein de ces plages que l'on. trouve des microfilaires, de même qu'au sein des follicules inflammatoires à cellules épithélioïdes et géantes.

Ces auteurs ont vu également que ces amas d'éosinophiles disparaissaient après épreuve thérapeutique à la diéthyl-carbamazine. De plus faisant une biopsie chez un porteur d'ascaris, non filarien, présentant 37% d'éosinophiles dans le sang, ils ont vu que l'architecture du ganglion était complétement différente de ce que l'on voit habituellement dans la filariose et qu'en particulier aucune infiltration notable d'éosinophiles n'était visible, alors qu'elle est considerable chez les filariens présentant parfois une éosinophilie sanguine très basse. (8 à 10%).

Eosinophilie et syndrôme broncho-pulmonaire: symptômes bronchiques, asthmatiformes et ombres labiles pulmonaires. — L'éosinophilie pulmonaire etant d'origine allergique, il est manifeste que la filariose de Bancroft, maladie hypersensibilisante, en soit une des causes les plus importantes.

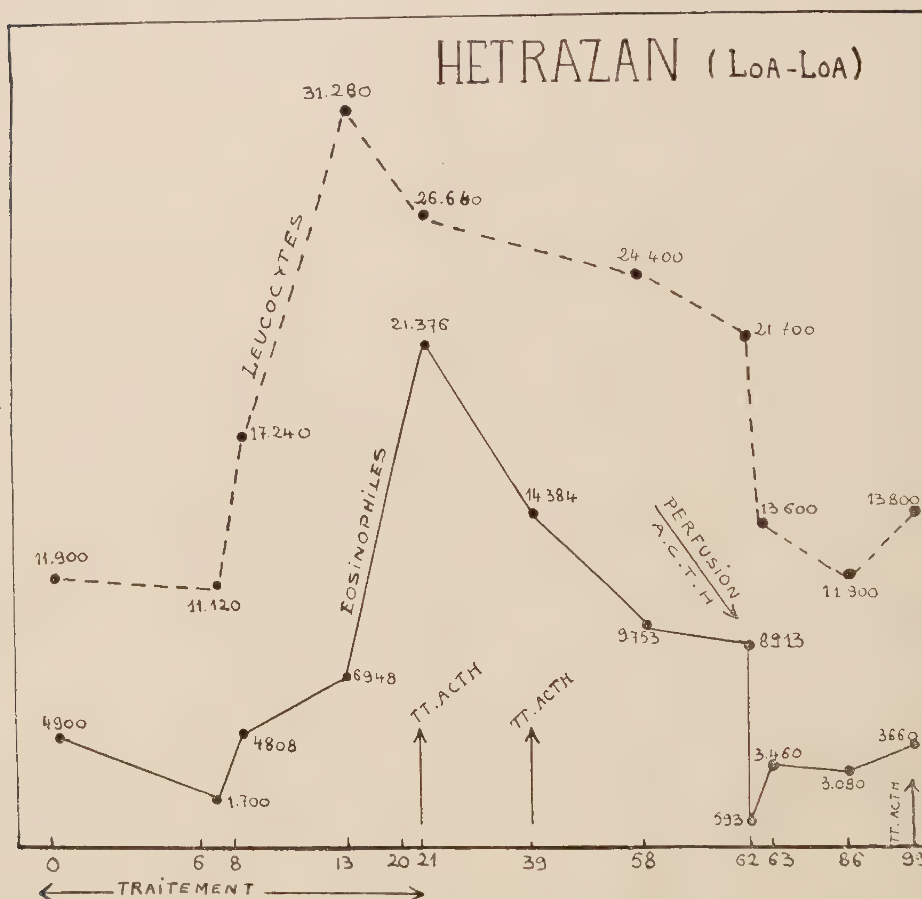


Fig. 1. - Cas de filariose à *Loa-loa* traité par l'Hétrazan - 3 tests de Thorn négatifs et une perfusion à l'ACTH ont été pratiqués - L'hyperéosinophilie est dûe au traitement.

Nous avons dit que certains auteurs (O'Connor, 1923) avaient signalé la fréquence de l'asthme chez les filariens. Meyers et Kouwenaar (1939) rapportent que deux malades, sur sept cas d'adénopathies avec éosinophilie sanguine élevée, présentaient de l'asthme bronchique et deux cas de néphrite hémorragique qu'ils considèrent comme l'éosinophilie, comme des phénomènes allergiques.

Toujours en ce qui concerne l'éosinophilie pulmonaire, ou syndrôme pulmonaire, ou asthme allergique, Malhotra (1949) en a rapporté six cas qui démontrent l'importance de la filariose dans le développement de cet asthme

allergique. L'auteur a vu exactement les mêmes signes (asthme, éosinophilie, ombres labiles) dans un cas d'infestation par *Taenia solium* et qui disparurent après le traitement.

Nous avons dit plus haut que Friess, Pierrou et Segalen avaient constaté la grande fréquence de la triade: adénopathie (avec microfilaires), bronchite et ombres pulmonaires, forte éosinophilie sanguine.

La plupart des auteurs s'accordent sur le caractère d'origine allergique de ce syndrôme.

Eosinophilie et thérapeutique. — En principe les agents thérapeutiques provoquent dans les affections à helminthes, une hausse du nombre des leucocytes et des éosinophiles qui diminue ultérieurement.

En ce qui concerne l'hétrazan notézine (I-diéthyl-carbamyl-4-méthylpipérazine), les résultats que nous avons obtenus avec R. Mille sont assez variables. Une leucocytose légère se produit au cours des premières heures, mais la réaction la plus remarquable est le bouleversement de la formule sanguine par une augmentation du pourcentage des granulocytes. Le nombre des éosinophiles s'abaisse nettement le premier jour du traitement, pour remonter ensuite et atteindre ou dépasser plus ou moins le taux initial (Tableau 1).

Tableau 1.

Traitement par l'Hetrazan (Tahiti). Variations de l'éosinophilie.

	Leucocytose	Avant	1er jr.	7 e jr.	Doses
1	Leucocytes	7.200	11.000	9.000	14 mg. 3 fois par jour per 7 jours.
	Eosinophiles . . .	11	3,6	17	
2	Leucocytes	6.000	9.000	9.000	125 mg. 3 fois par jour, per 7 jours.
	Eosinophiles . . .	11	5	14	
3	Leucocytes	7.000	10.000	7.500	120 mg., 3 fois par jour
	Eosinophiles . . .	13	5	19	
4	Leucocytes	10.500	12.000	20.000	120 mg., 3 fois par jour
	Eosinophiles . . .	22	7	23	
5	Leucocytes . . .	9.500	8.000	12.000	120 mg., 3 fois par jour
	Eosinophiles . . .	32	21	43	
6	Leucocytes	47	73	40	50 mg., 3 fois par jour
	Eosinophiles . . .	18	9	38	

SEGALEN, dans le cas de *W. malayi,* signale la régression rapide de la leucocytose et l'éosinophilie (26.000 à 8.000 leucocytes, et 69% à 1% d'éosinophiles en 15 jours dans un cas). Quand le traitement est insuffisant l'éosinophilie peut récidiver jusqu'à 30%. D'ailleurs cet auteur rapporte qu'avec les arsenicaux (stovarsol, arsenobenzol) on obtient une rétrocession de 14% à 2% d'éosinophiles.

OTTO, JACHOWSKI et WHARTON (1953) à Fita-Fita (Samoa) trouvent à l'état normal 450 à 3.100 éosinophiles, en moyenne 960. Essayant comparativement l'hétrazan et la thiacetarsamide, ils observent une augmentation variable du nombre des éosinophiles jusqu'au 15e jour environ quand le nombre des microfilaires était supérieur à 25. Au dessous l'augmentation ne se produisait pas. De toute façon l'augmentation est plus sensible et rapide avec le Thiacetarsamide.

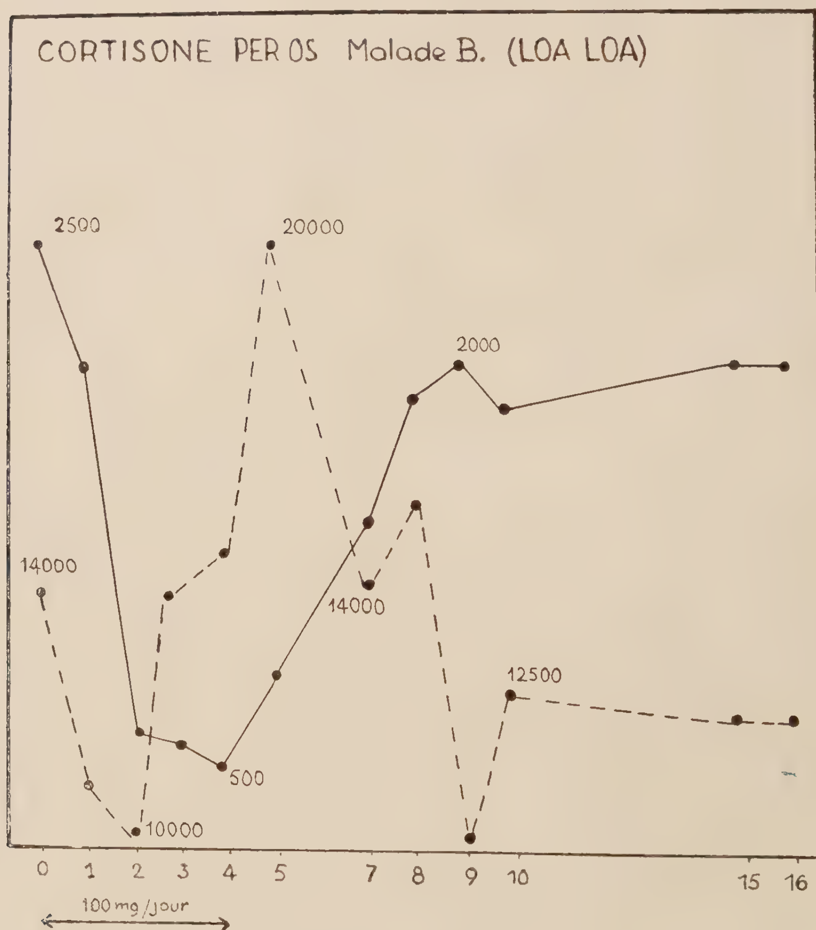


Fig. 11. – Cas de filariose à *Loa - loa* traité par la Cortisone per os (100 mgr. par jour pendant 4 jours). On observe une chute immédiate du nombre des éosinophiles qui remonte dès cessation du traitment.

Dans le cas de *Loa-loa* d'après J. SCHNEIDER, l'éosinophilie n'est pas modifiée de façon constante, immédiatement par le traitement, mais dans de nombreux cas, il s'accompagne d'une augmentation importante ainsi que des leucocytes, surtout chez des sujets très infestés chez lesquels l'éosinophilie préexistante était modérée. Dans un cas chiffre est passé de 15 à 60%. Par contre lorsque le taux initial dépasse 50%, il est rare de le voir augmenter et il diminue plutôt dès la fin du premier traitement.

Dans un cas récent nous avons montré (1954) que sous l'effet du traitement le nombre des éosinophiles est descendu d'abord de 4.900 à 1.700 le 7e jour, puis est remonté brusquement pour atteindre le chiffre considérable de 21.376 par mm^3 le 21e jour. Notons aussi le 99e jour il y avait 3.660 éosinophiles, c'est à dire à peu près le même taux qu'au début de l'expérience, bien que les microfilaires aient complètement disparu au cours des premiers jours du traitement.

Il paraît donc évident, d'après ces différents résultats, que cette éosinophilie est une manifestation d'allergie dû à l'hyperactivité du tissu reticulo-endothélial sous l'influence du traitement.

Effets de l'A.C.T.H. et de la Cortisone. — DELBARRE (1950) avait signalé l'irréductibilité de l'éosinophilie filarienne au cours du test de Thorn (25 mgr. d'ACTH par voie intra-musculaire et numération 4 heures après).

WARTER et MOÏSE (1953) utilisant une dose plus forte, ont vu dans un cas de *Loa loa* le nombre des éosinophiles passer de 5.140 à 4.600 en 4 heures (test négatif), mais ensuite à 1.740 en 6 heures et à 820 en 8 heures. Dans un second cas la chute immédiate fut plus marquée, 9.200 à 6.140, mais le résultat du test est néanmoins positif.

Nous avons montré (1953) dans 12 cas de *Loa loa* associée à *D. perstans* que le test avait donné un résultat négatif (irréductibilité) 9 fois, positif (labilité) 3 fois.

Dans un cas cité plus haut, un malade à *Loa loa* a présenté au cours de 4 test une éosinophilie irréductible. Par contre une perfusion intraveineuse avec 10 mgr. d'ACTH. a provoqué une éosinopénie considérable (chute de 8.913 à 593), puis une remontée au bout de 24 heures. Mais un dernier test de Thorn classique pratiqué un mois après a été, comme les 3 premiers, absolument négatif.

Dans les divers cas envisagés plus haut nous confirmons ce que nous disions plus haut, c'est qu'il y a une différence très nette entre les individus de race blanche et de race noire. Non seulement les premiers ont une éosinophilie plus importante mais elle est également irréductible par l'ACTH, (test de Thorn négatif). Par contre chez les noirs les résultats sont très variables. Sur six Sénégalais, 2 test nettement positifs, 1 nettement négatif et les autres et trois avec une labilité des éosinophiles de 25%.

Dans un cas de *W. malayi* nous avons constaté un résultat négatif.

Nous avons essayé également l'effet de la cortisone dans plusieurs cas de *Loa loa*. On sait que, contrairement à l'A.C.T.H. qui agit sur les éosinophiles par l'intermédiaire du cortex surrénal, la cortisone exerce son effet directement. Par conséquent dans tous les cas, si la cellule éosinophile est normale, il devrait y avoir labilité de l'éosinophilie.

TABLEAU II.

Test de Thorn dans la Filariose (Loa - loa *et* perstans)

NOM	Diagnostic	Avant A. C. T. H.			Après A. C. T. H.			Résultats		
		Nombre de Leucocytes	Nombre d'éosinophiles	% Eosinophiles	Nombre de Leucocytes	Nombre d'éosinophiles	% Eosinophiles	Variations de l'Eosinophilie valeur absolue	%	Test
I. Mang	Loa-Loa	14.180	3.440	23	10.620	3.104	29	— 336	— 10	—
II. Gil	»	12.220	4.780	39	13.360	3.708	27	— 1.072	— 22	—
III. Manda	»	6.060	368	6	8.860	532	6	+ 164	+ 41	—
IV. Barn	»	12.820	4.268	35	17.840	4.404	30	+ 136	+ 3	—
V. Kakou	»	6.880	300	4,5	10.800	208	2	— 92	— 27	—
VI. Sadou	»	6.280	166	2,5	7.120	50	0,7	+ 116	— 60	+
VII. Daporé	»	8.060	432	5,3	11.280	164	1,4	— 268	— 62	+
VIII. Sané	»	4.190	614	14,6	7.300	732	10	+ 118	— 19	—
IX. Baldé	»	10.440	1.200	11,5	7.100	900	12,6	— 300	— 25	—
X. Andoua	»	4.210	420	10	3.580	306	8,5	— 114	— 27	—

Nous avons utilisé la dose totale de 200 mgr. en 48 heures par prise de 25 mgr. par voie buccale. Un premier essai a été fait sur deux tirailleurs Sénégalais. Les résultats on été diametralement opposés. Chez l'un la chute du nombre des éosinophiles a été, au bout de 48 heures, de 21% pour le sang capillaire et 4% pour le sang veineux; chez l'autre la chute a été de 38% au doigt et 47% à la veine.

Dans un autre cas chez un Africain du Cameroun l'éosinophilie est irrèductible, passant de 384 à 360 en 48 heures, donc résultat négatif.

Par contre chez cette malade de race blanche citée plus haut, deux tests à la cortisone, l'un avec 200 mgr en 2 jours, l'autre 400 mgr. en 4 jours ont montré dans le premier cas une chute de 2.772 à 1.288 le 3e jours, et dans le deuxième une chute de 2.490 à 740 le 5e jour et remontée ensuite à 1.570 le 7e jour. Aussi les 2 fois il y a eu une remontée immédiate dès la cessation du traitement.

Ainsi l'épreuve à l'ACTH et surtout à la cortisone démontre que les individus de race noire réagissent différemment dans le cas de la filariose. La cortisone qui détermine dans tous les cas une éosinopénie chez les blancs, ne la provoque pas ou très peu chez eux. Même à l'état normal chez des Africains non parasités, cette irréductibilité est frappante.

RESUME

L'importance particulière de l'éosinophilie sanguine dans les différentes filarioses a été notée depuis déjà fort longtemps. Nous avons eu surtout en vue *Wuchereria bancrofti*, *W. malayi*, qui vivent dans les vaisseaux et tissus lymphatiques et *Loa-loa* qui parasite le tissu conjonctif et dont les microfilaires viennent, périodiquement ou non, dans le sang.

Les causes de l'éosinophilie sanguine n'ont pas été précisées et ont été l'objet de controverses. Son accroissement au cours des phases aigües a fait penser que ces leucocytes prenaient naissance dans les tissus enflammés ou le liquide d'oedéme aux dépens des histiocytes formés sur place. Pour d'autres il n'y a aucun rapport entre les deux catégories de cellules, les polynucléaires éosinophiles prenant naissance uniquement dans les organes hémopoiëtiques. Il semble évident qu'il n'existe aucune action éosinotactique spécifique de la part du ver, mais les substances sécrétée sont chimiotactiques pour toutes les catégories de polynucléaires.

Quoiqu'on en ai dit la périodicité de la microfilarémie n'a aucune influence sur les variations de l'éosinophilie.

L'intensité de l'éosinophilie sanguine est variable suivant les pays du monde. Elle peut être considérable chez les individus de race blanche, mais elle est toujours plus faible chez les Africains et les Asiatiques particuliérement. Il n'y a pas de rapport entre l'éosinophilie et la microfilarémie, ni avec l'intensité des symptomes cliniques et particuliérement l'éléphantiasis dans le Pacifique Sud.

Cette éosinophilie faible observée chez des filariens dans les pays tropicaux n'est pas due à une association parasitaire, à un polyparasitisme qui épuiserait, soit disant, le pouvoir éosinophilogène réactionnel de l'organisme. Ce qui caractérise en effet la filariose, c'est la persistance de l'éosinophilie à un taux élevé pendant plusieurs années même en dehors de toute crise inflammatoire.

L'éosinophilie tissulaire caractèrise les lésions jeunes. Elle est provoquée exclusivement par la mort du ver adulte et des microfilaires. Il se produit une infiltration considérable visible à l'oeil nu, thrombosant et infiltrant la paroi des vaisseaux, nécrosant certains organes, provoquant souvent la formation d'abcès éosinophiliques. Ces phénoménes sont dûs à una réaction allergique aigüe, provoquée par la désintégration des vers, chez des individus hypersensibilisés, et qui n'a rien de commun avec l'inflammation d'origine septique.

L'éosinophilie d'origine filarienne qui est accompagnée parfois par le syndrome broncho - pulmonaire (asthme, ombres labiles) est d'origine allergique comme ces symptomes qui ont été décrits dans différents pays d'hyperendémicité filarienne.

Au cours de la therapeutique specifique (hetrazan - notèzine) des variations de l'éosinophilie ont été signalées. Il y parfois une augmentation considérable dans le cas de *Loa - loa*.

L'hormone hypophysaire corticotrope (ACTH) a un effet variable sur l'éosinophilie d'origine filarienne : l'irréductibilité est surtont fréquente (test de Thorn négatif), chez les blancs, dans le cas de *Loa - loa*. Chez les noirs les résultats sont moins nets.

La cortisone produit une éosinopénie qui cesse en même temps que le traitement. Chez les noirs il y a souvent irréductibilité, ce qui confirme ce que nous avons dit au sujet de la différence de comportement racial vis à vis des filaires et vis à vis des hormones corticotropes et cortico - surrénales.

RIASSUNTO

L'importanza particolare della eosinofilia sanguigna nelle varie filariosi è stata notata già da lungo tempo. Abbiamo preso in considerazione soprattutto *W. bancrofti* e *W. malayi*, che vivono nei vasi e tessuti linfatici. e *L. loa*, che invade il tessuto connettivale, le cui microfilarie si riversano, periodicamente o no, nel sangue.

Le cause dell'eosinofilia non sono state precisate e sono state oggetto di controversie. L'aumento degli eosinofili nel corso di periodi acuti ha fatto pensare che questi leucociti nascano nei tessuti infiammati o nel liquido di edema a spese degli istiociti formatisi sul posto. All'infuori di ciò non esiste alcun rapporto fra le due categorie di cellule, poichè gli eosinofili polinucleati nascono unicamente negli organi emopoietici. Sembra evidente che non esiste alcuna azione eosinotattica specifica da parte del verme, ma le sostanze sono chemiotattiche per tutte le categorie di polinucleati.

In ogni caso la periodicità della microfilariemia non ha alcuna influenza sulle variazioni dell'eosinofilia.

L'intensità dell'eosinofilia varia nei diversi paesi. Essa può essere considerevole negli individui di razza bianca, ma è sempre più bassa negli Africani e particolarmente negli Asiatici. Non vi sono rapporti fra l'eosinofilia e la microfilariemia, e fra la prima e l'intensità dei sintomi clinici ed, in particolare, l'elefantiasi del Pacifico del Sud.

Tale bassa eosinofilia osservata nei filariosici dei paesi tropicali non è dovuta ad una associazione parassitaria, a un poliparassitismo che esaurirebbe, per così dire il potere eosinofilogeno di reazione dell'organismo.

Ciò che in effetti caratterizza la filariosi è la persistenza dell'eosinofilia ad un tasso elevato durante molti anni anche al di fuori di ogni crisi infiammatoria.

L'eosinofilia tissulare caratterizza le lesioni recenti. Essa è provocata esclusivamente dalla morte del verme adulto e delle microfilarie. Si produce una infiltrazione considerevole visibile ad occhio nudo, che provoca la trombosi, infiltra la parete dei vasi, necrotizza alcuni organi, e provoca sovente la formazione di ascessi eosinofilici. Questi fenomeni sono dovuti ad una reazione allergica acuta, provocata dalla disintegrazione dei vermi, negli individui ipersensibilizzati, che non ha nulla in comune con l'infiammazione di origine settica.

L'eosinofilia di origine filariosica che è accompagnata a volte dalla sindrone bronco-polmonare (asma, *ombra labile*) è di origine allergica.

Durante la terapia specifica (hetrazan - notézine) sono state segnalate delle variazioni dell'eosinofilia. Vi è a volte un aumento considerevole nei casi di *Loa - loa*.

L'ormone ipofisario corticotropo (ACTH) ha un effetto variabile sull'eosinofilia di origine filariosica; l'irriducibilità è soprattutto frequente (prova di Thorn negativa) nei bianchi. Nel caso della *Loa - loa* nei negri i risultati sono meno netti.

Il cortisone produce una eosinofilia che cessa contemporaneamente al trattamento. Nei negri vi è sovente irriducibilità, il che conferma ciò che abbiamo detto a proposito della differenza di comportamento razziale verso le filarie e verso gli ormoni corticotropi e cortico - surrenali.

SUMMARY

The particular importance of blood eosinophilia in the various filariasis has been noted a long time ago. We have taken into consideration above all *W. bancrofti* and *W. malayi*, which live in the lymphatic vessels and tissues, and *L. loa*, which invades the connective tissue, whose microfilariae, periodically or not, invade the blood.

The causes of eosinophilia have not been determined and have been the object of much controversy. The increase of eosinophils during acute stages has led to the belief that these leukocytes are born in the inflammatory tissues or in the oedema li-

quid at the expence of the histiocytes which are locally formed. Except that, there is no reaction among the two types of cells, since the polynuclear eosinophils are born only in the hemopoietic organs. It seems evident that the worm has no specific eosinotactic action, but the substances are chemotactic for all types of polynuclear leukocytes.

In any case the periodicity of microfilariae in blood has no influence on the variations of eosinophilia.

The intensity of eosinophilia is different in the various countries: it can be considerable in white people, but it is always lower in Africans and especially in Asiatics. There is no relation between eosinophilia and microfilariae in blood, nor between the former and the intensity of clinical symptoms and, particularly, of elephantiasis of South Pacific.

Such a low eosinophilia of tropical countries is due to a parasitic association, to a polyparasitism which «exausts» the eosinophilogenic reacting power of the organism.

What in effect characterizes filariasis is the persistency of eosinophilia at a high level for several years, even without inflammatory crisis.

The tissural eosinophilia characterizes the new lesions. It is due exclusively to the death of the adult worm and of microfilariae. A considerable infiltration is produced, which is visible at naked eye, determining the trombosis, the infiltration of the vascular walls, the necrosis of some organs, and often the formation of eosinophilic abcesses.

These phenomena are due to an allergic acute reaction, determined by the disintegration of worms, in hypersensitized individuals, which has nothing in common with the inflammation of septic nature.

The eosinophilia determined by filariae is sometimes accompanied by the bronco-pulmonary syndrome (asthma, etc.) and is of filaric origin.

During the specific therapy (hetrazan - notézine), variations of the eosinophilia have been reported. In cases of *L. loa* there is some times a considerable increase in eosinophilia.

ACTH has a variable effect on eosinophilia determined by filariae. The irreducibility is particularly frequent (Thorn's test negative) in white people, while in the case of *L. loa* in negroes the results are less marked.

Cortisone determines an eosinopenia which ceases contemporarily with the treatment. In negroes there is often irreducibility which confirms what we have said in regard to the difference of racial behaviour of eosinophilia toward filariae and toward corticotropic and cortico - adrenal hormones.

BIBLIOGRAPHIE

BONNE C. (1919) Over hyperéosinophilie in de mit gecombineerd met een filaria-infectie. *Geneesk Tidjs. V. Nederl. Indie*, LXXIX, 874-876.

BROCHARD V. (1910) Eosinophilie dans la filariose et éléphantiasis. *Bull. de la Soc. de Path. Exot.* , 609.

CALVERT (1902) *J. Hopkins Hosp. Bull. June.*

FRIESS, PIERROU, MIMOUN, JULIA et SEGALEN. (1953): La filariose lymphatique à son stade de début. *Algérie Médicale*, p. 436.

FULLEBORN F. (1929): Filariosen der Menschen. *Hand. der pathogenen Mikroorgan. VI*, 1043-1224.

GALLIARD H. (1933): L'éosinophilie sanguine au cours des filarioses chez les indigènes du Gabon. *Sang., VII* n. 7.

GALLIARD H., LAPIERRE J., LARIVIERE M. & BERDONNEAU R. (1953): Test de Thorn à l'A.C.T.H. et autres épreuves du fonctionnement cortico - surrénal dans des cas d'infestation par les helminthes. *Ann. de Parasit. hum. et comp.* XXVIII, n° 5-6.

GALLIARD H. et LARIVIERE M. (1953) : Recherches sur l'éosinophilie au cours de la filariose à *Loa - loa* et de son traitement. Effets de l'ACTH et résultats des tests d'insuffisance surrénale. *An. de Parasit. Hum & Comp., XXVIII*, n° 4.

GALLIARD H. et MILLE R. (1949) : Essais de traitement de la filariose à Wuchereria bancrofti var Pacifica par le I-diéthyl-carbamyl, 4-méthyl-pipérazine. à Tahiti. *Bull. de la Soc. de Path. Exot., XLII*, 304-313.

GALLIARD H. et. NGUYEN-HUU-PHIEM. (1936) : Les formes cdiniques de la filariose urogénitale au Tonkin. *Bull. de la Soc. méd. Chir. Indochine*, n° 9.

GULLAND. (1903) : Condition of blood in filariasis. *Jour. Trop. Med.*, 277.

HARTZ Ph. H. (1944) : Contribution to the histopathology of filariasis. *Amed. Journ. of clinic. path., XIV*, n° 1.

HARTZ Ph. H. (1953) : Dead microfilaria and eosinophilic granulocytes. *Docum. de Med. Géogr. et Trop., V*, 378.

HARTZ Ph. H. (1950) : Filarial orchitis. *Docum. Neerl. et Indon. de Morbis Tropicis., II*, n° 2.

HARTZ Ph. H. et VAN DER SAR A. (1948) : Tropical eosinophilia in filariasis. Occurrence of radiating processes about microfilaria. *Amer. J. clin. Path. XVII*, 637-44.

LAVIER G. (1944-45) : L'éosinophilie sanguine dans les helminthiases. *Le sang., XVI*, 510, 528.

LOW G. C. (1912) : Persistence of eosinophilia and persistance of absence of embryos in a case of Filaria loa infection *Jl. Trop. Med.*, 38.

MANSON - BAHR PH. (1912) : Filariasis and Elephantiasis in Fiji. London Witherby et Co.

MALHOTRA S. L. (1949) : Filarial eosinophiliosis. *Indian Med. Gaz., LXXX*, 292-5.

MAROTTE et MORVAN. *Arch. Mal. Coeur.* (Cités par RIEUX, 1924).

MEYERS F. M. et KOUWENAAR W. (1939) : hypereosinophilic an over en merkwaardigen vorm van filariasis. Geneesk. Tidjs. v. Nederl. Indie., *79*, 853-873.

MONTPELLIER J, LACROIX A. et BOUTIN S. (1921) : Note hématologique concernant les sujets infestés par Onchocerca volvulus. *Soc. Path. Exot. XIV*, 653.

NATTAN - LARRIER L. (1922) : La thrombo-lymphite filarienne du canal thoracique. *Bull. Soc. Path. Exot., XV*, 412.

NATTAN - LARRIER L. et PARVU M. (1909) : La valeur de l'éosinophilie chez les malades porteurs de Filaria Loa. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss. et sang., II*, 15.

O' CONNOR F. W. (1923) : Researches in the Western Pacific. 1923. *Res memoirs of the London school of Trop. Med., IV*.

O' CONNOR F. W. et HULSE C. R. (1932) : Some pathological changes associated with Vuchereria bancrofti infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., XXV*, 445-454.

OTTO G. F., BROWN H. W., BELL S. D. jr. et THETFORD N. D. (1952) : Arsenamide in the treatment of infections with the periodic form of the filaria, Wuchereria bancrofti. *Amer. Journ. of Trop. Med & Hyg., I.*, n° 3.

OTTO G. F., JACHOWSKI L. A. jr. et WHARTON J. D. (1953) : Filariasis in American Samoa. III. Studies on chemotherapy against the non-periodic form of Wuch. bancrofti. *Amer. Journ. of. trop. med. & hyg, II*, n° 3.

PAUTRIZEL R. (1948) : Recherches expérimentales sur l'éosinophilie tissulaire provoquée par les helminthes. Bordeaux.

REISEL J. H. et GROEN J. (1951) : Tropical eosinophilia and filariasis. *Nederl. Tidjschr. v. geneesk. 95* (II), 1736-44.

REMLINGER (1902) : L'éosinophilie dans la filariose. *C.R. Soc. Biol., LIV*, 1145.

ROGERS W. A. (1913) : Note on a case of Loa Loa. *Ann. Trop. Med., VII*, 363.

ROSE F. G. (1926) : Studies in filariasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med., XX*, 198.

SCHNEIDER J. (1950) : Traitement de la filariose à F. Loa par le I-diéthyl-carbamyl-4-méthylpipérazine. *Bull. de la soc. de path. exot., XLIII*, 270-274.

SEGALEN J. (1953) : De la filariose lymphatique (W. malayi) et de ses rapports avec l'éosinophilie tropicale. *Thèse. Alger.*

SICARD J. A. et BLAIS (1902): Eosinophilie dans la filariose humaine. *C.R. Soc. Biol.*, *LIV*, 1427.

TRIBONDEAU M. (1902): Indications fournies sur la pathogénie de l'éléphantiasis par les recherches hématologiques *Soc. Biol.*, *LIV*, 1420.

TRIBONDEAU M. (1902): Objection à la théorie filarienne. *Soc. biol.*, *LIV*, 1419.

VAN DEN SAR A. et HARTZ H. (1954): the syndrôme tropical eosinophilia and microfilaria *Amer. Jl. Trop. Med.*, *XXV*, 83.

VAQUEZ et CLERC (1902): Eosinophilie dans la filariose humaine. *C. R. Soc. Biol.*, *LIV.*, 1427.

WARTMAN W. (1944): Lésions of the lymphatic system in early filariasis. *Amer. J. Trop. Med.*, *XXIV*, 299.

WARTMAN W. B. (1947): Filariasis in American Armed forces in World War II. *Medicine.* 26, 333-94.

WHYTE D. (1909): Filarial periodicity and eosinophilia. *J. trop. Med.*, 175.

WINCKEL W. E. F. et FROSS J. (1952): Contribution to the geographical pathology of Surinam. Acute lympahdenitis caused by Wuchereria bancrofti. *Dec. de Med. Geograph. et Trop. IV*, 361.

WURTZ R. et THIROUX A. (1905): Séméiologie des maladies tropicales.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

A HAEMOGREGARINE IN *ARGAS BRUMPTI*

P. C. C. GARNHAM (*)

Introduction

In the course of examination of coxal fluid from newly fed *Argas brumpti* ticks for the presence of spirochaetes, Mr. A. E. C. Harvey of the Division of Insect-Borne Diseases, Kenya, noticed large numbers of oval cysts which Dr R. B. Heisch, the Director of the Division, thought were of a coccidial nature. Films and infected ticks were sent to me for examination, but it was not until much more material was seen that the possible nature of the parasites was determined. The new material was collected on a visit to the Kitui district of Kenya in April, 1954, and to Egypt in May, 1954. The former was arranged by Dr. R. B. Heisch, and the Egyptian material was placed at my disposal at NAMRU in Cairo by Mr. H. Hoogstraal, who had collected it a few weeks earlier from South East Egypt near the Sudan border. Notes on the bionomics of *A. brumpti* in Kenya and Egypt respectively have been published by Walton (1950), Heisch (1954) and Hoogstraal (1955), and a detailed study of the anatomy of *Argas* was made by Robinson & Davidson (1913). The tick is found in low-lying, dry, hot country, essentially in two types of environment — underneath stones or rocks lying on other larger pieces of rock, or in dry earth in small caves or clefts in rocky hills. The latter are occupied by hyrax, porcupine and lizards in Kenya, and Heisch (1954) showed by precipitin tests that 50 per cent of the ticks had fed on porcupines and none on hyrax. Porcupines do not occur in Egypt, where lizards form the chief source of blood for the tick. In Kenya also it is probable that lizards are just as important — their blood is not identifiable at present by precipitin tests, but examination of recently fed ticks revealed the presence of lizard corpuscles in the gut. It is interesting to note that at least one month after the last possible feed, some ticks still showed numerous undigested corpuscles. In captivity, nymphs and

(*) *London School of Hygiene and Tropical Medicine - Department of Parasitology.*

adults were found to feed readily on the abdominal skin of lizards (geckos and agamids).

The purpose of this paper is to describe the different stages of the parasite and to discuss its identification.

Material and methods

Large numbers of all stages of *Argas brumpti* from Kenya were examined. A few came from Isiolo in the Northen Frontier District, but most came from several localities in the Kitui district from places just above or just below 600 metres in altitude. About 50 ticks were also examined in Cairo which had been collected by Mr. H. Hoogstraal in Wadi Darawena. Numerous lizards were examined in Kenya and the probable vertebrate host of the parasite was found.

The parasite was observed in fresh preparations. It was also studied in wet fixed films stained with Heidenhain's haematoxylin, in air-dried films stained with Giemsa's stain, and in sections of the tick. The tick was fixed in Carnoy's or Bles' fluid after incisions had been made to allow the fixative to penetrate, it was then put through the methyl benzoate, celloidin process, followed by double embedding. Sections were stained with Ehrlich's haematoxylin and eosin, Giemsa, and by the Feulgen-light green method.

Stages in the tick

The stage most frequently encountered in the tick was the sporocyst; earlier stages of sporogony were much less common, and were only seen in late instars or adults. The sporocysts on the other hand were present in all stages from the second instar nymphs to the mature tick. The description of the early stages is taken largely from a single Egyptian specimen, though a few developmental forms were also seen in the Kenya material. All the early stages were inside the gut, where they were most numerous adjacent to the epithelium; no intracellular stages were found.

Zygote: The youngest zygotes (Fig. 1) seen were round or slightly oval in contour and were about 15 μ in diameter. They contained a large nucleus consisting of four structures — a central, densely staining karyosome, a finely-beaded network lying alongside the karyosome (probably the early stage of the

---

Plates I. and II. All figures are camera lucida drawings of *Hepatozoon argantis* sp. nov. from sections of *Argas brumpti*, and stained by the Giemsa - colophonium or Ehrlich's haematoxylin method, except where stated.

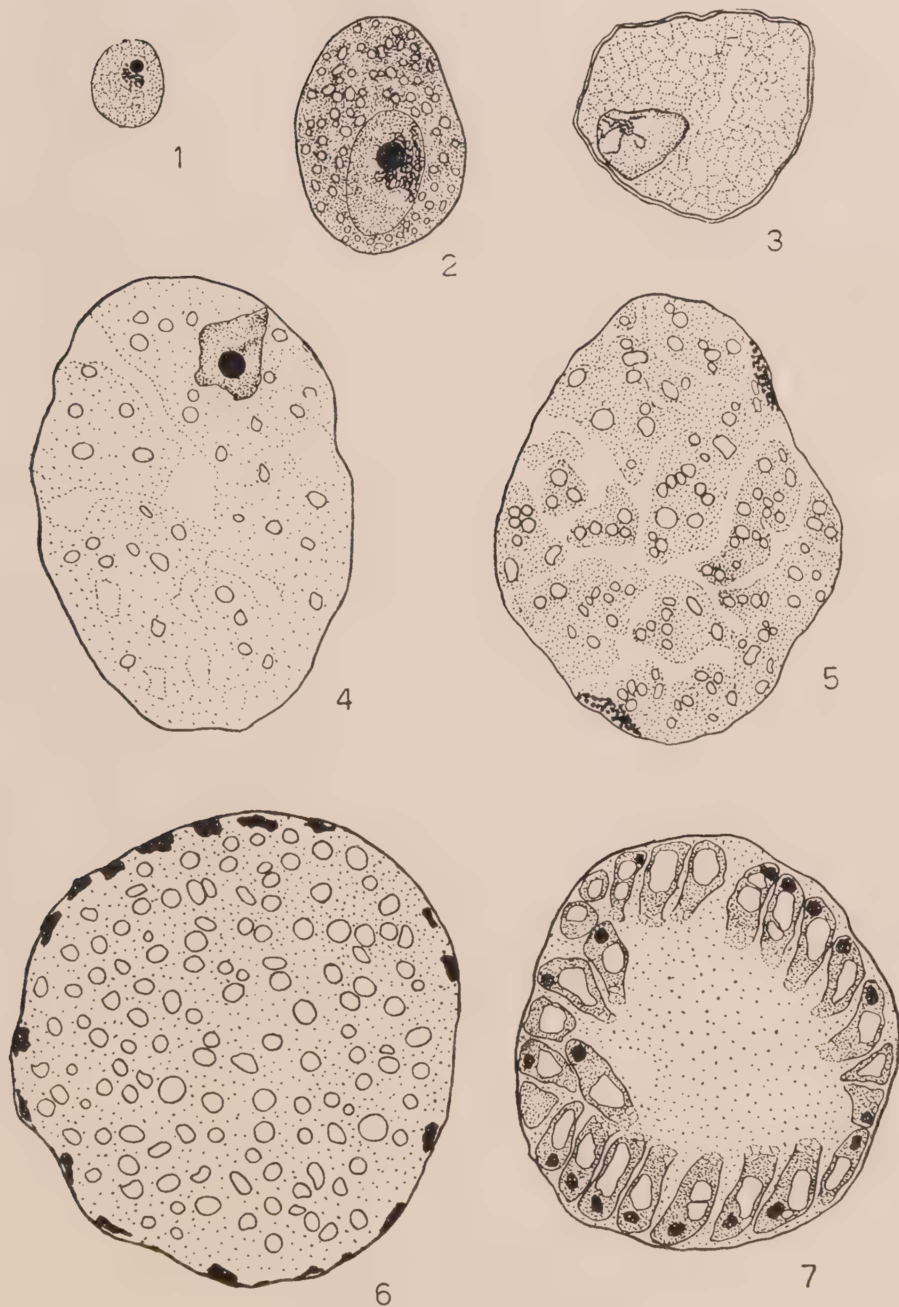
Fig. 1. - 4. - Stages in growth of the zygote.

Fig. 5. - Early nuclear division of zygote.

Fig. 6. - Peripheral distribution of nuclei.

Fig. 7. - Immature oöcyst with sporoblasts arranged in parallel rows.

PLATE I



30 μ.

W. COOPER. del.

« reduction spindle »), a large, pale area, in which the preceding structures lie, and all are enclosed by a fine nuclear membrane. The cytoplasm of the zygote is very characteristic at this stage — it is densely granular and stains a deep blue colour with Giemsa's stain. The zygote increases greatly in size, and by the time it has reached 40 μ in length and the nucleus 20 μ, the « reduction spindle » is usually easily visible as a tangled skein on which are strung densely staining beads (Fig. 2 and 3). With further growth, the cytoplasm of the zygote loses its density and becomes finely vacuolated (Fig. 4), and the cell membrane, hitherto conspicuous, becomes attenuated. The parasite probably reaches nearly its maximum size before the nucleus divides; it is now 80-90 μ in diameter. Throughout this period, the nucleus is Feulgen-negative.

Oöcyst: The nucleus divides and the two portions go to opposite poles (Fig. 5); further division takes place until the organism becomes studded on its surface with numerous, deeply staining nuclei (Fig. 6). The nuclei are now heavily Feulgen-positive. In the meantime, very characteristic changes are occurring in the vacuolated cytoplasm — eosinophilic condensations form which later move outwards, as cylinders, to enclose the peripheral nuclei.

Sporoblasts: In this way, the sporoblasts are produced, and in their earliest form they are seen lying in rows, pointing to the interior of the oöcyst with the nucleus of each still peripheral, and leaving an empty space in the centre of the oöcyst (Fig. 7). Next to the nucleus is the eosinophilic material and beyond that fine cytoplasm. The size of the oöcyst varies from 80 to 100 μ or even more (120 μ in fresh preparations) and each sporoblast measures when fully grown about 20 μ in length. Later the sporoblasts lose their symmetrical arrangement and lie haphazardly (Fig. 8) inside the oöcyst. In a fresh specimen the cyst wall is easily ruptured, and the oval or crescentic sporoblasts stream out. In an oöcyst, 80 μ in diameter, 363 sporoblasts were counted in serial sections.

Several ticks from Kenya showed rare developmental forms in the gut which appeared to be retarded oöcysts. The parasite had grown to a large size (in one instance to 150 μ) and was surrounded by a curious thick spiky membrane (Fig. 9). inside were numerous sporoblasts, round or oval in shape with single nuclei and with no obvious cyst wall. Presumably the wall of the oöcyst

---

Fig. 8. - Oöcyst with sporoblasts arranged haphazardly.

Fig. 9. - Post-mature oöcyst with wall much thickened and showing spiky deposit.

Fig. 10.-13. - Stages in development of the sporocyst

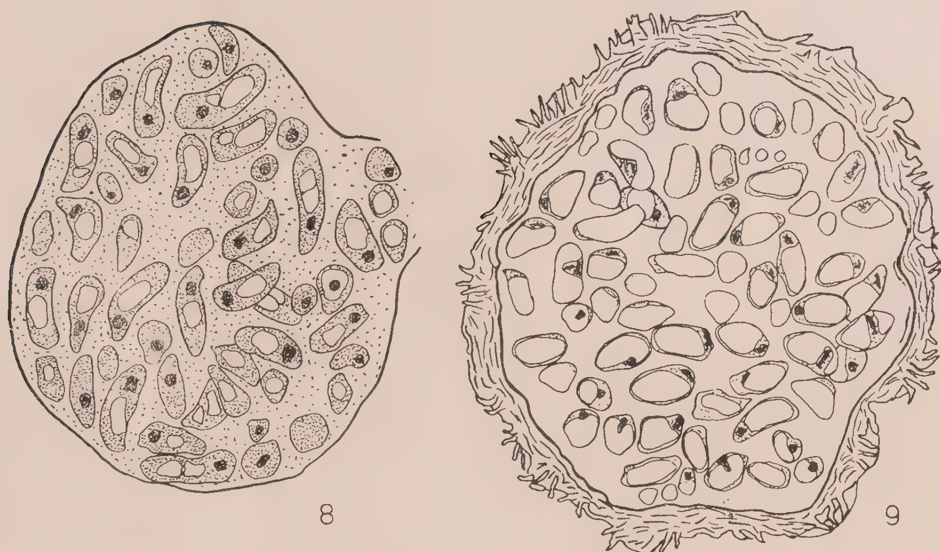
Fig. 14. - Mature sporocyst in air-dried smear of haemocoele fluid. Giemsa.

Fig. 15. - Sporozoites. Wet-fixed smear of haemocoele fluid. Heidenhain's Haematoxylin.

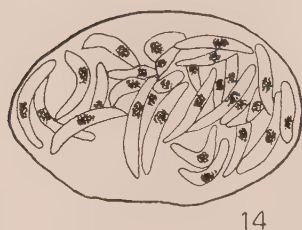
Fig. 16. - Sporozoites. Wet-fixed smear of haemocoele fluid. Heidenhain's Haematoxylin.

Fig. 17 - Haemogregarines in blood of agamid lizard. Giemsa. a - uninfected erythrocyte; b - adult forms; c - young form.

PLATE II















W. COOPER. del.

had failed to rupture and prolonged exposure in the gut of the tick had led to the formation of a crystalline deposit. REICHENOW (1921) described a retardation of development of the oöcyst in mites infected with *Karyolysus*. The ordinary type of mature oöcyst as seen in *Hepatozoon* was never encountered. It seems as though the sporoblasts are unable to progress any further in their development inside the oöcyst; even if rupture of the oöcyst is delayed, sporoblasts remain unchanged. It is only when the latter are set free that the nucleus divides and a cyst wall is formed, giving rise to sporocysts. On the other hand, it is possible that the oöcyst wall is so fragile that slightest handling of the tick causes it to rupture, in which case intact oöcysts would hardly ever be found. In sections of several specimens, the majority of sporocysts were seen to be clumped inside the gut (Fig. 18), and Professor REICHENOW (1954) in a private communication suggested that such clumping might have been the result of the bursting of the oöcyst membrane at the end of growth with separation of sporocysts.

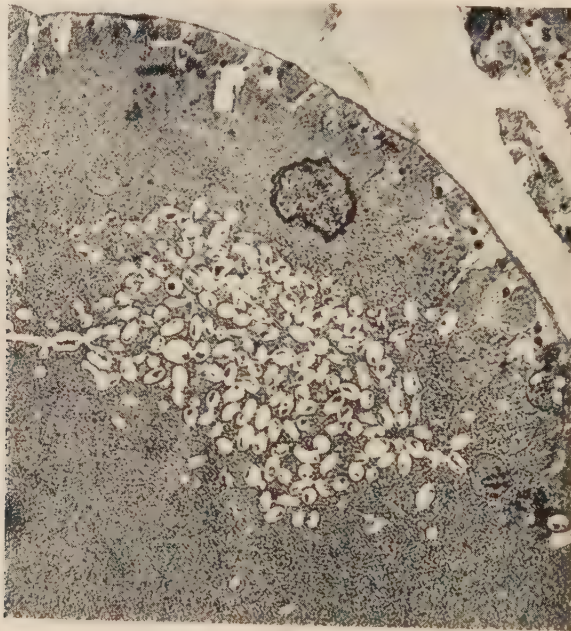


Fig. 18. - Photomicrograph of section of tick showing retarded oöcyst and clumping of oval sporocysts. (× 80).

Sporocysts: Sporocysts were first seen in the clear fluid, thought to be coxal fluid, secreted shortly after the nymph had fed. They were also found in the haemocoelomic fluid exuding from a cut made through the chitin at the edge of the integument, or after a leg had been pulled off. They were later found to be most numerous in the contents of the gut, and were observed in the

faeces, in fresh smears of gut contents and in sections. Sections showed that the parasite was confined to the haemocoelomic cavity and to the gut — it was never found in the Malpighian tubules, salivary glands, ganglia or other organs. Immature sporocysts were seen in the haemocoelome. The number of sporocysts varied from specimen to specimen: sometimes none was found in the haemocoelomic fluid, while the gut harboured a few; in other specimens, hundreds of thousands were present throughout the arthropod.

Immature sporocysts were not very common. Nuclear division does not apparently take place until the parasite is nearly full grown, because the earliest stages seen, with 4 or 8 nuclei (Fig. 10 and 11), were practically the same size as mature forms. The young forms were oval in shape and measured about 38 $\mu \times 30 \mu$. The nuclei were large and each one consisted of 8 deeply staining dots. The cytoplasm contained an eosinophilic residual body of vague outline; later it became bubbly or vacuolated (Fig. 12). In the older forms the nuclei increase in number and decrease in size, but still exhibit the same granular structure.

Mature sporocysts (Fig. 13 and 14) vary considerably in size even in the same tick. Their size commonly fluctuates between about 30×25 and $50 \times 40 \mu$ in old infections, where the sporocysts were scanty, forms as large as $78 \times 40 \mu$ were seen. Egyptian and Kenya material showed no specific differences in type of sporocysts. In fixed material in sections the sporocysts were a little smaller than in the fresh state. The cyst wall is fairly easily broken and the sporocyst will not withstand desiccation. Post-mature sporocysts were seen in which the sporozoites were dead and bacterial invasion of the cavity had occurred. The number of sporozoites in a sporocyst varied between 12 and 40; in one apparently undamaged specimen, only 4 sporozoites were found. It is difficult to know how much true variation in number exists, because many cysts are degenerate or immature; possibly, 40 represents the typical number.

Sporozoites: Sporozoites are curved, banana-shaped bodies, 20-27 μ in length and about 4 μ wide (Figs. 15 and 16). In the fresh state, they exhibit changes of shape and movements of a characteristic type. A sporozoite inside the sporocyst will remain still for about half a minute, then it shortens its length, becoming almost round, and suddenly springs back to its original form, like a bent finger suddenly extending. One end is markedly pointed and this can be seen thrusting against the cyst wall. Occasionally, the sporozoites were seen to move slowly around inside the sporocyst. A similar kind of movement was described by MILLER (1908) in sporozoites of *Hepatozoon muris;* it is probably characteristic of a wide range of coccidial parasites. Preparations stained with Heidenhain's haematoxylin showed the following structures: A nucleus which is usually not quite central, with a fine nuclear membrane enclosing a variable number (about 10) of granules; cytoplasm which is often shrunk away from the limiting membrane of the organism, and 1, 2, 3 or rarely

more «globules» in the cytoplasm. The globules are visible in fresh preparations as round or oval hyaline bodies of different sizes but as a rule smaller than the nucleus; they do not absorb Romanowsky stains, but stain black with Heidenhain's haematoxylin; they are Feulgen-negative (in contrast to the nucleus which is positive). The globules are probably food material of a similar nature to the chromatoid bodies of *Entamoeba* cysts. The crescentic outline of the sporozoite is sometimes interrupted by a swelling near one end; this may possibly be a degenerative change.

Stages in the lizard

Attempts to transmit the infection from ticks to lizards failed, though only a few trials were made and these were unsatisfactory because either the lizard died before the parasite could have reached the blood (which takes a minimum of 6 weeks in *Karyolysus* according to Döflein, 1953) or the viability of the sporocysts was doubtful. Lizards, particularly agamids, were extremely numerous in most places where *Argas brumpti* was found in Kenya; and in the place (Ngomeni) where the incidence of the parasite was highest, one specimen of *Agama mossambica* was found with gametocytes in the blood. They are described below.

Gametocytes: Haemogregarines in the erythrocytes were regular sausage-shaped forms with a well defined margin and hyaline cytoplasm in which lay usually a few granules (Fig. 17). The nucleus was large and consisted of a number of heavily staining irregular pieces, and stretched from one margin of the parasite to the other. The erythrocyte itself was usually destroyed, or appeared so in air-dried films; when still extant, it was larger than an uninfected corpuscle. The nucleus of the erythrocyte on the other hand was always visible and had undergone distortion — it first became elongated or flattened against the side of the parasite or curved like a cap around one pole, and it later became split into two fragments. A smaller stage (Fig. 17 c) of haemogregarine was seen less frequently; this was a round or squat form containing a very large nucleus.

Discussion

The identification of the parasite in the tick presented a riddle which even now is not entirely solved. At first it was thought that the presence of cysts in the coxal fluid indicated that the parasite was a *Legerella*, but sections of infected ticks showed that the Malpighian tubules were not invaded and this genus was excluded. Later the identification seemed to lie between *Karyolysus*, *Hepatozoon* and an acephaline gregarine. The parasite was unlikely to be a gregarine because (a) there was no association in pairs, (b) there were no ga-

metocysts with sporocysts and (c) sporocysts contained many sporozoites. Differentiation between the two genera of haemogregarines was less easy. *Hepatozoon* (of mammalian origin) is known to occur in ticks or mites, while *Karyolysus* has been fond only in mites. The major difference between the two genera is that in the case of *Karyolysus,* sporokinetes form inside the oöcyst, break out, invade the egg and give rise to a sporocyst infection in the larva of a new generation (Reichenow, 1921). In *Hepatozoon,* the oöcyst gives rise to sporoblasts and then directly to sporocysts. In the present material, oöcysts with sporoblasts alone were found, and these stages were difficult to interpret. The following possibilities may be considered:

1. The sporoblasts were in fact sporokinetes of *Karyolysus.* Their shape however was round or oval and not slim and vermiform, like those of *Karyolysus.* Free sporokinetes were absent and no infection of the egg was seen.

2. The sporoblasts were transformed into sporocysts inside the oöcyst, as occurs in *Hepatozoon canis* or *muris,* but handling of the ticks always caused rupture of the mature forms. It seems, though, that in at least some of the many specimens examined, an unbroken mature oöcyst would have been found. Wenyon (1926) mentions that in *H. canis,* the oöcyst ruptures in the tick and sporocysts are found scattered through its tissues.

3. Development ceased in the oöcyst at the sporoblast stage; the oöcyst ruptured and a cyst wall was formed around each sporoblast which then became a sporocyst and nuclear division followed. No free sporoblasts were encountered, but occasionally, developing stages of sporocysts were seen in the haemocoelome or gut. Further support for this third alternative is provided by the observation that in fresh material slight pressure on an oöcyst causes the emergence of round or oval bodies quite unlike mature sporocysts.

Another point difficult to interpret is the presence of sporocysts both inside and outside the lumen of the gut. This is more suggestive of *Karyolysus,* but it could be found in *Hepatozoon* if some of the amoeboid zygotes penetrated the gut epithelium (as they always do in *H. canis*) and developed in the haemocoelome, whilst others remained behind in the lumen.

There are several minor points in the morphology of the organism which probably have more specific than generic significance. The parallel organization of sporoblasts inside the oöcyst is more like *Karyolysus* than the « fern-leaf » forms described by Miller (1908) in *Hepatozoon.* The number of sporozoites — up to 40 — found in the present material, again more resembles *Karyolysus* (in some species of which, e.g. *K. biretortus,* 40 or more exist) than *Hepatozoon* where the number does not appear to exceed 24. On the other hand, no zygotes were ever seen with remains of the microgametocyte in close apposition; in *Karyolysus* the male remains attached until the zygote is quite large, while

the zygote of *Hepatozoon* is exactly like the forms seen in the *Argas* material.

The granular nuclei and the inclusion bodies in the sporozoites bear a close resemblance to the sporozoites of other haemogregarine species.

BRUMPT (1938) described stages in the development of *Haemogregarina mauritanica* in the intestine of the hard tick *Hyalomma syriacum*. Sporocysts containing 16 sporozoites were found, and also large oval bodies with prominent karyosomes. BRUMPT thought that the latter would divide to form sporoblasts, but the complete cycle was never observed. The vertebrate host of this haemogregarine was a tortoise. These forms bear some resemblance to the *Argas* parasites, and confirm their haemogregarine origin.

The nature of the parasites seen in *Argas brumpti* is clearly that of a haemogregarine. The sporogonic stages most resemble those of *Hepatozoon*, though the apparent rupture of the oöcyst prior to formation of sporocysts, indicates a difference which may possibly be of generic degree. Until further evidence is available, it would appear desirable to identify the parasite as *Hepatozoon*, and the specific name of *argantis* is proposed. The vertebrate host is probably an agamid lizard or *Tarentola*. It should be noted that *Hepatozoon* has been seen in other cold-blooded animals, e.g. in the crocodile by HOARE (1932), by GARNHAM (1950) in snakes and by MOHAMMED & MANSOUR (1955) in Cairo lizards.

ACKNOWLEDGMENTS

I have much pleasure in thanking Dr. R. B. HEISCH and Mr. H. HOOGSTRAAL for provision of material; also Professor E. REICHENOW for examining a few sections, and Dr. C. A. HOARE for allowing me to see the late Dr. Wenyon's *Hepatozoon canis* material in ticks.

SUMMARY

1. *Hepatozoon argantis* sp. nov. is described as a parasite of *Argas brumpti*, with *Agama mossambica* and other lizards as the probable vertebrate host.

2. The common stage in the tick is the sporocyst (containing up to 40 sporozoites), found inside the gut and in the haemocoelomic cavity.

3. Developmental stages were confined to the lumen of the gut, and included zygotes and oöcysts.

4. Development in the oöcyst appeared to stop short at the sporoblast stage; the formation of sporocysts takes place after the oöcyst has ruptured. Such a process does not occur in *Hepatozoon*, and it is possible that a new genus is concerned.

5. The structure of the nucleus is typical of haemogregarines. Also, a sudden transformation occurs when the zygote nucleus divides – from being Feulgen - negative, it becomes strongly Feulgen - positive and remains so in further division up to the sporozoite stage.

RIASSUNTO

1. - Viene descritto *Hepatozoon argantis* sp. nov., un parassita di *Argas brumpti*. L'ospite vertebrato del parassita è probabilmente *Agama mossambica*, o altre lucertole.

2. - Lo stadio più comune nella zecca è la sporocisti (contenente fino a 40 sporozoiti), che si trova nell'intestino e nella cavità celomatica.

3. - Stadi di sviluppo sono stati repertati solo nel lume dell'intestino, e comprendono zigoti ed oocisti.

4. - Lo sviluppo nell'oocisti appare fermarsi allo stadio di sporoblasto; la formazione delle sporocisti ha luogo dopo che l'oocisti si è rotta. Tale processo non avviene in *Hepatozoon*, ed è pertanto possibile che si tratti di un nuovo genere.

5. - La struttura del nucleo è tipica delle emogregarine. In più, quando il nucleo dello zigote si divide ha luogo una repentina trasformazione: da Feulgen-negativo diventa decisamente Feulgen-positivo e tale rimane nelle ulteriori divisioni fino allo stadio di sporozoite.

BIBLIOGRAPHY

Brumpt, E. (1938): Formes évolutives d'*Haemogregarina mauritanica* chez la tique *Hyalomma syriacum*. *Ann. Parasitol.*, ec, 350.

Doflein - Reichenow E. (1953): Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena, G. Fischer Verlag. Part II.

Garnham, P. C. C. (1950): Blood parasites of East African vertebrates with a brief description of exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium pitmani*. *Parasitology*, *40*, 328.

Hirsch, R. B. (1954): The presence of *Argas brumpti* in the Kitui District of Kenya. *East African Med. J.*, *31*, ...

Hoare, C. A. (1932): On protozoal blood parasites collected in Uganda, with an account of the life cycle of the crocodile haemogregarine. *Parasitology*, *24*, 210.

Hoogstraal, H. (1955): Ticks of the Anglo-Egyptian Sudan with special reference to Equatoria Province. In press.

Miller, W. W. (1908): *Hepatozoon perniciosum* (n. g., n. sp.); A haemogregarine pathogenic for white rats; with a description of the sexual cycle in the intermediate host, a mite (*Lelaps echidninus*). Hygienic Laboratory - Bulletin 46 Washington.

Mohammed, A. H. H. e Mansour N. (1955): In press.

Reichenow, E. (1921): Die Haemococcidien der Eidechsen. *Arch. Protist.* 42, 179.

Reichenow, E. (1954): Private Communication.

Robinson, L. E. e Davidson, J. (1913): The anatomy of *Argas persicus* (Oken, 1818). Part II. *Parasitology*, *6*, 217.

Walton, G. A. (1950): *Argas brumpti* Neumann 1907 (Argasidae, Ixodoidea) in Kenya Colony. *East African Med. J.*, *27*, 207.

Wenyon C. M. (1926): Protozoology. Vol. II. London.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SISTEMA CAPILLARE NEL COMPLESSO NEUROENDOCRINO DI *MUSCA DOMESTICA* L. E *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MEIG.

REMO GRANDORI (*) e LUIGIA GRANDORI (*)

Molte incertezze vertono sulle fini strutture dell'apparato neurosecretore nei Ditteri Muscidi, che, essendo fra gli insetti superiori di più alta e complessa struttura, presentano il massimo interesse.

Al fine di portare un contributo al progresso della conoscenza istologica del suddetto apparato, abbiamo eseguito nuove ricerche sulla fine struttura del cerebro e delle vie neurosecretrici di *Musca domestica* e di *Calliphora erythrocephala* allo stadio adulto.

E' in corso di stampa nel volume dedicato alla memoria di Filippo Silvestri un ampio studio di uno di noi (L. Grandori) sulle trasformazioni morfologiche dell'apparato neurosecretore di queste due specie durante la metamorfosi. Da quello studio abbiamo fatto punto di partenza per le nuove indagini di cui esponiamo qui i risultati.

Compiuta la ninfosi e scomparse le ghiandole secretrici degli ormoni della metamorfosi, l'apparato neurosecretore risulta formato in queste due specie dalle cellule neurosecretrici della *pars intercerebralis*, dal corpo cardiaco e dal *corpus allatum*. Al corpo cardiaco arrivano, come negli altri insetti, i nervi cardiaci che sono essenzialmente costituiti dagli assoni delle cellule nervose secretrici della *pars intercerebralis*.

Gli studi anatomo-istologici fondamentali di Hanström e di B. ed E. Scharrer hanno condotto a considerare l'apparato neurosecretore degl'Insetti come paragonabile al sistema formato dai nuclei nervosi ipotalamici e dalla neuroipofisi dei Vertebrati. Questo parallelismo fisiologico ha provocato interessanti ricerche comparative che in linea di massima sono venute a convalidare la fondatezza di tale parallelismo. Mentre però alcuni Autori (13) hanno

---

(*) *Istituto di Entomologia Agraria dell'Università di Milano.*

limitato lo studio delle funzioni neurosecretrici del suddetto apparato, almeno nei Muscidi adulti, ai fenomeni di crescita collegati alla maturazione delle cellule germinali femminili, noi abbiamo pensato invece che tali funzioni potessero estendersi anche ai fenomeni dell'attività sessuale in entrambi i sessi. Quindi il nostro studio si è svolto in modo particolare sugli adulti in accoppiamento.

Abbiamo perciò proceduto nel modo seguente: adulti maschi e femmine, durante l'atto dell'accoppiamento, venivano fissati e poi disgiunti mentre erano ancora nel fissativo, e quindi imparaffinati e sezionati. All'esame delle sezioni anche i maschi hanno rivelato nelle cellule neurosecretrici una evidente e spiccata attività.

La colorazione all'ematossilina cromica Gomori, per quanto non specifica dei neurosecreti e soltanto indicativa di un'attività neurosecretrice, ha rivelato come, tanto nei Vertebrati che negli Insetti, il neurosecreto migra lungo gli assoni delle cellule neurosecretrici accumulandosi nei Vertebrati in corrispondenza alla neuroipofisi.

Secondo alcuni Autori, negli insetti il corpo cardiaco avrebbe funzione simile alle neuroipofisi, e in esso quindi finirebbero le fibre dei neuroni secretori.

Ma il simposio di Napoli sulle neurosecrezioni (1953) ha portato alla conclusione che almeno una parte dei corpi cardiaci funziona come ghiandola a secrezione interna, producendo un ormone simile all'adrenalina e attivo sul cuore degli Insetti.

D'altro canto lo studio della letteratura che riguarda il simpatico dorsale degli Insetti (sistema che dal punto di vista anatomico e funzionale è strettamente legato a quello neuro-endocrino) ci ha convinti che lo studio anatomico approfondito di tale sistema — che risultava fatto solo per pochi insetti — era necessario per illuminare le relazioni fisiologiche fra i vari organi e sistemi collegati al processo della neurosecrezione. Il Dott. Baccolo ha iniziato tale studio sulle larve di *Calliphora*, e lo sta completando anche negli adulti delle due specie di Muscidi che formano oggetto del presente lavoro: i risultati da lui raggiunti danno un'idea della complessità dei rapporti fra sistema neuro-endocrino e simpatico dorsale (1), rivelando fra l'altro nel ganglio ipocerebrale — anche per *Calliphora* e *Musca* come per *Oryctes* — la presenza di neuroni sensori il cui assone decorre fino al gaglio frontale. Di che natura sia lo stimolo che agisce su tali neuroni non è possibile ancora dire, ma è certo che essi si trovano sulle vie percorse dal secreto che scende dalle cellule neurosecretrici, come hanno dimostrato gli esperimenti della Thomsen (14).

* * *

Un altro problema che rimaneva ancora oscuro era quello della messa in circolo dell'ormone delle cellule neurosecretrici negli Insetti.

E' noto che i nuclei ipotalamici, formati nei Vertebrati da cellule neuro-

secretrici, sono fra i centri più riccamente vascolarizzati del sistema nervoso (B. ed E. SCHARRER, HANSTRÖM, ecc.) e in essi quindi la messa in circolo del principio attivo si ammette avvenga rapidamente attraverso le vie vasali. Recentemente MATSUMOTO (9) metteva in evidenza nel ganglio toracico di un crostaceo (*Eriocheir*) ricco di cellule neurosecretrici, un sistema capillare derivante dalle ramificazioni di arteriole che entrano dal lato ventrale del ganglio e si riformano dorsalmente, e l'A. giungeva alla conclusione che il neurosecreto viene ceduto alla circolazione del corpo attraverso i capillari.

Negli insetti un sistema vasale intratissulare non è stato mai posto in evidenza dai precedenti A.A. In studi precedenti di uno di noi (L. GRANDORI) si era giunti alla conclusione che l'assieme di cellule non nervose, dall'A. chiamate *cellule accompagnatrici* o *satelliti*, numerose lungo le vie neurosecretrici rappresentate dai nervi cardiaci, avessero importanza per il trasporto del neurosecreto (5, 7).

Ma la complessità della struttura del cerebro dei Muscidi ci ha portato a distinguere, a prescindere dalle cellule nervose coi loro prolungamenti e dalle cellule giganti, tre formazioni:

1) il sistema delle ramificazioni delle trachee, abbondantissime in tutto il cerebro;

2) le guaine di Schwann, o nevrilemmi;

3) il sistema delle cellule accompagnatrici.

Per quanto le tre formazioni siano strettamente legate, noi abbiamo per ora concentrato la nostra attenzione soprattutto sul sistema delle cellule accompagnatrici che appaiono abbondantissime lungo i nervi cardiaci nel tratto esterno al cerebro e nell'interno del corpo cardiaco, tanto nelle larve che negli adulti di *Calliphora e di Musca.*

Le microfotografie di MATSUMOTO (9) sul sistema capillare del ganglio toracico di *Eriocheir* e quelle del lavoro di HANSTRÖM (8) che mettono in evidenza le relazioni fra capillari e cellule neurosecretrici nell'Orang-utan, rafforzarono il nostro convincimento sull'importanza delle cellule satelliti come formanti un sistema di trasporto del neurosecreto.

D'altra parte, rivedendo i nostri preparati colorati con ematossilina cronica Gomori, profonde somiglianze fra alcune sezioni del cerebro di *Calliphora* e *Musca* adulte e alcune microfotografie del lavoro di HANSTRÖM, suggerirono ad uno di noi l'idea che le cellule accompagnatrici formassero un sistema di vasi paragonabili, almeno funzionalmente, e limitatamente alla messa in circolo del neurosecreto, a quello dei Vertebrati e di *Eriocheir*. La prima comunicazione su questo argomento è stata fatta in una nota preliminare (6).

MATERIALE E TECNICA

Come materiale di base abbiamo usufruito dei preparati che avevano servito ai precedenti studi fatti esclusivamente su femmine adulte dallo sfarfallamento alla piena attività funzionale dell'apparato riproduttore.

Basandoci sul presupposto che tutto l'apparato neurosecretore dovesse presiedere negli adulti a tutta l'attività sessuale, abbiamo fissato maschi e femmine in accoppiamento.

Fissativi usati: Bouin, Zenker.

Coloranti: ematossilina Carazzi-eosina; ematossilina cromica Gomori-eosina o floxina; colorazione tricromica Masson con bleu di anilina; colorazione con acido perjodico secondo Lillie e Mc. Manus, modificata con eliminazione dei coloranti citoplasmatici e nucleari.

Reperti al microscopio

Attività delle cellule della pars intercerebralis *durante l'accoppiamento.* — Tanto nel maschio che nella femmina in accoppiamento, l'ematossilina cromica Gomori dimostra un'intensa attività delle cellule della *pars intercerebralis,* con diverse gradazioni di grandezza dei granuli di secreto, talora radi e talora addensati nel citoplasma. Più spiccata è nella femmina l'attività delle cellule neurosecretrici durante l'accoppiamento che non durante la deposizione delle uova.

Oltre alle cellule che si colorano con l'ematossilina Gomori, la *pars intercerebralis* presenta cellule nervose floxinofile più grandi, che uno di noi aveva interpretato come grandi cellule motrici, malgrado che la presenza di vere cellule motrici nel cerebro degl'Insetti non sia ammessa dagli altri Autori. Tale interpretazione si basava sul fatto che qualche grossa fibra proveniente dalle cellule della *pars intercerebralis,* dopo il chiasma dei nervi cardiaci che si trova alla base dei lobi protocerebrali e dorsalmente all'esofago, decorre nel tritocerebro fino a raggiungere il connettivo nervoso ventrale del quale entra a far parte.

L'esistenza di grandi cellule nervose della *pars intercerebralis* il cui assone, evitando il chiasma dei nervi cardiaci, passa nel connettivo nervoso esofageo, era ammessa da Hanström, come attesta la fig. 268 riprodotta da Weber (pag. 273 del suo Lehrbuch der Entomologie, 1933).

Il numero delle cellule neurosecretrici colorate dalla Gomori è pressochè uguale nel maschio e nella femmina, e nelle sezioni orizzontali tali cellule circondano le più grandi cellule floxinofile che occupano la zona centrale della *pars intercerebralis.*

I nostri preparati dimostrano, in definitiva, che durante l'atto sessuale le cellule neurosecretrici della *pars intercerebralis* sono in grande attività in ambedue i sessi.

Vie di eliminazione del neurosecreto. — Al simposio di Napoli sulle neurosecrezioni (maggio 1953), le comunicazioni sugli esperimenti di B. Scharrer ed E. Thomsen avevano dimostrato che il neurosecreto delle cellule della *pars intercerebralis* migra lungo gli assoni dei nervi cardiaci, le cui terminazioni nei corpi cardiaci venivano ad accumulare in questi ultimi

il neurosecreto. Rimaneva però sempre oscuro il modo con cui tale neurosecreto venisse messo in circolo. D'altra parte un dato in apparente contrasto con le asserzioni di E. Thomsen è risultato dallo studio dei nostri numerosi preparati, dato convalidato da M. Thomsen (15), e cioè che la colorazione Gomori non ha messo in evidenza granuli di secreto lungo i nervi cardiaci nel tratto compreso fra l'uscita dell'assone dalla cellula e la sua entrata nei corpi cardiaci.

Solo all'interno di questi ultimi le fibre dei nervi cardiaci presentano in *Musca domestica* fini granulazioni disposte in serie e formazioni sporgenti dalle fibre (Fig. 1) in tutto simili agli *herring-bodies* raffigurati da B. Hanström per l'Orang-utan. Non ci è però possibile affermare se almeno alcune delle fibre dei nervi cardiaci terminino nei corpi cardiaci o se tutte le attraversino per raggiungere dorsalmente il *corpus allatum* e postero-ventralmente il ganglio ipocerebrale.

Ma oltre alle fibre nervose nei corpi cardiaci, L. Grandori ed E. Carè (7) avevano segnalato al simposio di Napoli la presenza di « rivoletti che pare interessino le cellule satelliti e i loro prolungamenti protoplasmatici ». Sono appunto questi rivoletti che, studiati in confronto con le figure di Hanström e di Matsumoto, si sono rivelati come formanti una propria canalizzazione che si intreccia alle fibre dei nervi cardiaci e che circonda le cellule dei corpi cardiaci. Si tratta di canali di estrema sottigliezza, con un calibro di micron 1,3-1,7 ivi compreso lo spessore delle pareti. Esse posseggono nuclei ovali estremamente appiattiti, lunghi circa 4 micron, larghi circa 3 micron, e in corrispondenza ad essi il calibro dei canalicoli risulta più o meno rigonfiato. Il contenuto dei canalicoli, che appare molto più fluido di quello di Fig. 5 e 6, ha assunto colorazione nero-fumo con l'ematossilina cromica Gomori.

Anche nella massa del cerebro, nel quale avevamo notato l'esistenza di una rete intercellulare di incerta natura, da noi interpretata come formata dalle cellule satelliti, abbiamo accertato che almeno le cellule nervose di medie e grandi dimensioni sono circondate da una vera rete di canalicoli ben evidenti anche con la colorazione Gomori.

Ma la conferma dell'esistenza di formazioni tubolari con parete propria richiedeva colorazioni ritenute specifiche, quali la tricromica del Masson e quella dell'acido perjodico di Lillie e Mc Manus, per mettere in evidenza l'eventuale esistenza di sostanze collagene o collageno-simili nella parete dei canalicoli, per stabilire eventualmente la presenza di una membrana paragonabile all'avventizia reticolare dei capillari sanguigni degli animali superiori. In effetti, con la colorazione Masson, usando il bleu di anilina, abbiamo ottenuto una colorazione positiva della parete dei canalicoli, e col metodo dell'acido perjodico una pallida colorazione in rosso vinoso che ha messo però nettamente in evidenza una rete capillare.

Le cellule neurosecretrici della *pars intercerebralis* sono circondate da ca-

nalicoli che presentano le massime dimensioni, raggiungendo un calibre di 3,5 micron, evidentemente resi turgidi dal neurosecreto assorbito (Figg. 5, 6). Nell'interno dei canalicoli maggiori (Fig. 6) vi è una sostanza non colorabile nè dalla Gomori nè dalla Masson riunita in areole irregolari.

E' lecito supporre — per l'apparato neurosecretore — che la corrente del neurosecreto contenuta nei capillari venga convogliata, almeno in parte, verso l'aorta, colla parete della quale i corpi cardiaci sono strettamente aderenti, e con tutta probabilità anche assieme al secreto proprio dei nervi cardiaci. Di tale interpretazione, che è per ora un'ipotesi, confidiamo che ulteriori ricerche diano la dimostrazione.

Discussione

Uno dei motivi che oltre alle somiglianze strutturali segnalate precedentemente ci ha indotti ad affrontare la ricerca delle vie di eliminazione del neurosecreto dal complesso neurosecretore dei Muscidi, è stato l'aver potuto constatare il modo con cui le cellule del seno deutocerebrale di Mosca e Callifora cedono il loro neurosecreto attraverso il pirenoforo ed il peduncolo (Fig. 10). Queste cellule ricordano cellule simili neurosecretrici segnalate fin dal 1941 da B. Scharrer (12) nel gnatocerebro di *Leucophaea* e quelle segnalate recentemente da Matsumoto (9) nel ganglio toracico di *Eriocheir*. Esse sono molto attive a partire dal 3° giorno della ninfosi, conservando tale attività, sia pure in forma molto attenuata, dopo lo sfarfallamento. I vacuoli similmente a

---

Fig. 1. - Parte di una sezione orizzontale dei corpi cardiaci di *Musca*, mostrante il percorso di diversi tratti di capillari con nuclei delle loro pareti - *cp*, capillari; *dn*, depositi di neurosecreto lungo le fibre nervose; *np*, nuclei delle pareti dei capillari; *fnc*, fibra dei nervi cardiaci. (Bouin; ematossilina cromica Gomori, eosina).

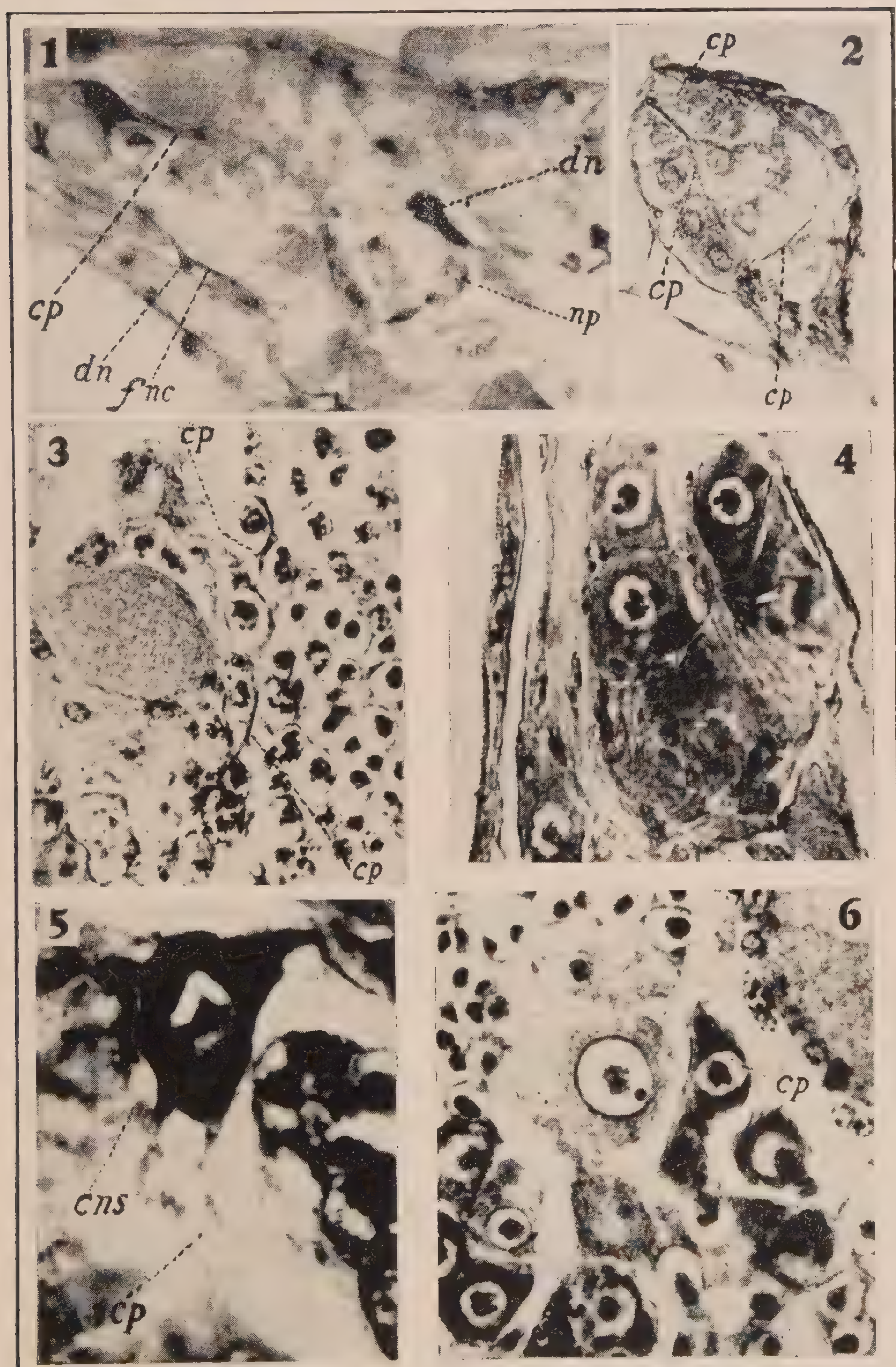
Fig. 2. - Sezione orizzontale di un lobo del corpo cardiaco di *Callyphora erythrocephala* femmina, 8 giorni dopo lo sfarfallamento. - *cp*, capillari. (Carnoy; Pappenheim Unna).

Fig. 3. - Sezione orizzontale del cerebro di un maschio di *Musca domestica* in accoppiamento. - *cp*, capillari. (Bouin alcoolico; Masson).

Fig. 4. - Sezione sagittale del corpo cardiaco in *Musca domestica*, maschio in accoppiamento. Ogni cellula del corpo cardiaco dall'intensa colorazione citoplasmatica è circondata da capillari con piccoli nuclei appiattiti che ne circondano il lume e con pareti colorate in blu intenso. (Bouin alcoolico; Masson).

Fig. 5. - Cellula neurosecretrice di *Musca domestica*, maschio in accoppiamento, con canalicolo aderente che si suddivide. La parte di esso che risulta nera nella microfotografia è in effetti colorata in nero dall'ematossilina cromica Gomori. La zona nerastra a sinistra della cellula neurosecretrice è colorata in rosso dall'eosina. - *c. n. s.*, cellula neurosecretrice; *cp*, capillari. Bouin; Gomori, eosina).

Fig. 6. - Sezione frontale della *pars intercerebralis* di *Musca domestica*, maschio in accoppiamento. Cellule floxinofile circondate da vasi capillari a parete colorata in blu. Contenuto dei capillari a masserelle incolori. - *cp*, capillari. (Bouin alcolico; Masson).


1
cp
dn
np
dn
fnc
2
cp
cp
cp
3
cp
cp
4
5
cns
cp
6
cp

quanto ha pubblicato MATSUMOTO, si presentano per lo più vuoti, ma alcuni contengono una sostanza che, con la colorazione tricromica Masson, assume una debole colorazione gialliccia. I vacuoli nel periodo di massima attività interessano tutto il corpo cellulare, compreso il peduncolo (collaterali non ne abbiamo ancora potuto mettere in evidenza), ma non si estendono all'assone (Fig. 9). Il decorso di quest'ultimo si può seguire lungo la parete dorso-laterale dell'esofago nella stessa direzione che assumono i nervi cardiaci dopo il chiasma. Le microfotografie dimostrano senza incertezze che i vacuoli versano il loro contenuto fra la parete cranica e la commessura deutocerebrale, riempiendo il seno deutocerebrale (Fig. 10). Ora sembra a noi ovvio che il neurosecreto debba venire allontanato o attraverso la parete cranica ad esso permeabile, e alla quale il seno è in immediato contatto, o mediante convogliamento attraverso un sistema lacunare-vasale, che alla fine sbocchi fuori della scatola cranica.

In quanto alle cellule neurosecretrici della *pars intercerebralis*, il fatto che il neurosecreto migri lungo gli assoni e si accumuli nel corpo cardiaco ed oltre, si deve tener distinto dal modo con cui tale neurosecreto viene mobilitato e posto in circolo. L'asserire che il neurosecreto delle cellule colorabili dall'ematossilina cromica Gomori si trova in quello strato submicroscopico di fosfolipidi legati a colesterolo che, secondo RICHARDS (11), delimita la fibra nervosa degli insetti, non significa che esso non possa essere ceduto dall'assone agli spazi lacunari, per la stessa considerazione fatta da HANSTRÖM (8)

Fig. 7. - Sezione sagittale del cervello di *Musca domestica*. Entrata di una trachea iniziantesi da un sacco aereo cefalico mediante un complesso ostiolare nella parte mediana posteriore del cerebro. Dopo breve percorso dall'entrata la trachea nella sezione risulta tagliata perchè continua in altra direzione. - *sa*, sacco aereo; *t*, trachea; *i*, apparato ostiolare all'entrata della trachea nel cerebro (Bouin; ematossilina cromica Gomori, eosina).

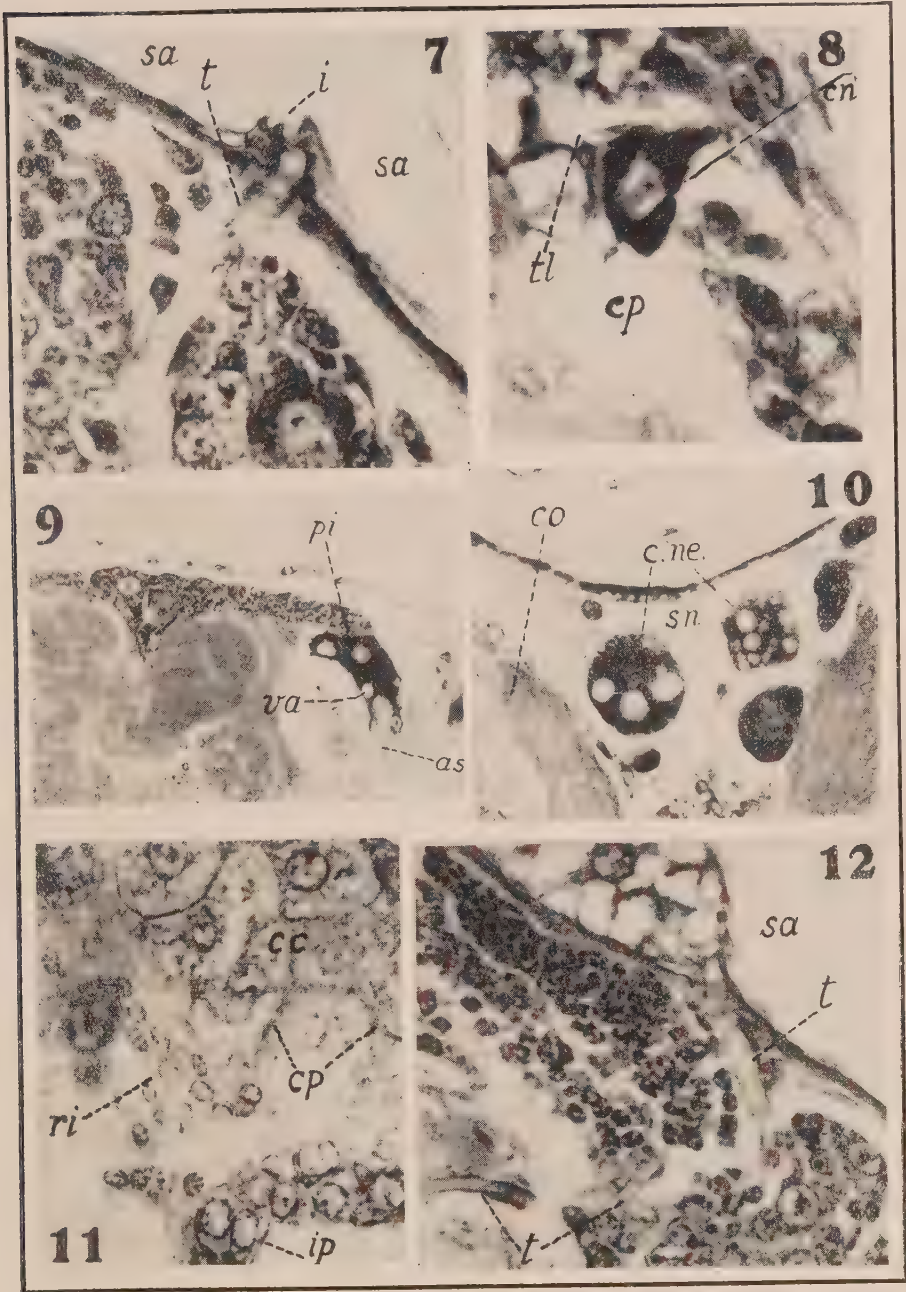
Fig. 8. - La stessa cellula di Fig. 5, presa in altro piano per mettere in evidenza la tracheola che decorre lungo l'orlo superiore della cellula. - *cn*, cellula nervosa; *cp*, capillare; *tl*, tracheola. (Bouin; ematossilina cromica Gomori, eosina).

Fig. 9. - Cellula neurosecretrice fortemente eosinofila del seno deutocerebrale in *Musca domestica*, femmina adulta. L'assone decorre lungo la parete interna dorso-laterale della scatola cranica adiacente all'esofago. - *as*, assone; *pi*, pirenoforo; *va*, vacuolo. (Bouin; ematossilina cromica Gomori, eosina).

Fig. 10. - Sezione orizzontale di una pupa di *Musca domestica* nel 3° giorno dopo l'inizio della ninfosi. Cellule del seno deutocerebrale in piena attività. I vacuoli si aprono nel seno deutocerebrale. - *sn*, seno deutocerebrale; *co*, commessura deutocerebrale; *cnc*, cellule neurosecretrici. (Bouin; ematossilina cromica Gomori, eosina).

Fig. 11. - Sezione orizzontale del corpo cardiaco di pupa di 8 giorni di *Calliphora erythrocephala*. - *ip*, ganglio ipocerebrale; *cp*, capillari; *ri*, nervo ricorrente; *cc*, corpo cardiaco. (Carnoy, ematossilina Carazzi, eosina).

Fig. 12. - Entrata e decorso di una trachea con ramificazioni nella zona dorsale del cerebro di *Musca domestica* adulta. - *t*, trachea; *sa*, sacco aereo cefalico. (Bouin, ematossilina cromica Gomori, eosina).


7
sa
t
i
sa
8
cn
tl
cp
9
pi
va
as
10
co
c.ne.
sn
11
cc
cp
ri
ip
12
sa
t
t

per i Vertebrati, che ci sembra molto logica, che proprio la localizzazione superficialissima della sostanza colorabile dell'assone, semprechè essa sia in qualche modo legata al neurosecreto, indicherebbe che essa è nella posizione di più facile e rapida mobilitazione. Che poi la sostanza che è uscita dagli assoni delle cellule neurosecretrici sia più o meno colorabile con l'ematossilina cromica Gomori, è una questione di secondaria importanza dinanzi all'ammissione ragionata della maggior parte dei fisiologi e anatomici che la messa in circolo del neurosecreto, immagazzinato o no, è effettuata dalla ricca rete capillare riscontrata nei nuclei neurosecretori dei Vertebrati e attorno alle cellule neurosecretrici di *Eriocheir*.

In quanto agli insetti, poco o nulla si sapeva precedentemente ai nostri studi della circolazione cefalica, ma le scarse notizie che abbiamo raccolto dimostrano contemporaneamente la ignoranza attuale su alcuni particolari anatomici e l'esistenza, segnalata per poche specie, di diramazioni cefaliche dell'aorta.

Nel 1893 NEWPORT segnalava in *Sphinx ligustri*, che l'aorta, giunta al cerebro, fra questo e la parete anteriore del capo, si allarga a mo' di sacco dando rami che vanno agli occhi e alle antenne. Nel 1895 PAWLOVA dimostrò l'esistenza di vasi antennali e GEROULD, in *Bombyx mori* adulto, ha trovato che l'aorta in avanti si prolunga in arterie che vanno agli occhi, alle antenne, alle mascelle. Si tratta di vasi immersi nel lacunoma e sostenuti da briglie connettivali. Ma non sappiamo peraltro che cosa accada di questi vasi quando essi raggiungono gli organi ai quali paiono destinati.

Non ci sembra azzardato, anche indipendentemente dal nostro reperto l'ammettere a priori la possibilità dell'esistenza nel cerebro degli insetti di un sistema lacunare-tubolare simile a quello che, ad esempio, permette la diffusione dell'emolinfa nelle ali, per quanto su di esso i pareri siano discordi.

Infatti, per alcuni entomologi (4) le nervature delle ali sono tuboli forniti di propria parete, entro cui scorrono trachee, fibre nervose ed emolinfa, la quale quindi fluirebbe fra la parete del tubolo (e da quali cellule sarebbe generata tale parete?) e la parete della trachea.

Secondo l'interpretazione di altri studiosi (16) le venature delle ali sono formate da un sistema di lacune e non di veri tuboli, attraversate da trachee, e il sistema lacunare-tracheale servirebbe all'apporto contemporaneo di emolinfa e di aria fra le due lamine alari.

Noi pensiamo che un organo così compatto e complesso come il cerebro, a forte attività metabolica, possa avere una circolazione lacunare-vasale, accompagnata da un sistema tracheale, similmente a quanto avviene nelle ali.

Per quanto concerne il sistema tracheale, abbiamo osservato che nel cerebro dei Muscidi entrano numerose trachee (fig. 7, 12) alcune delle quali, partendo da uno dei sacchi aerei cefalici, presentano all'ingresso nel cerebro un complicato meccanismo (Fig. 7), accompagnato da un gruppo di cellule diffe-

renziate, che ricorda molto la struttura degli stigmi. Le trachee cerebrali danno numerose tracheole che decorrono fra cellula e cellula nervosa, e delle quali una è ben visibile lungo il lato superiore della cellula neurosecretrice di Fig. 8, (la stessa cellula di Fig. 5) ma fotografata in un altro piano, tracheola contigua ma ben distinta dal capillare aderente alla cellula neurosecretrice.

Dal punto di vista critico la parola *capillari* da noi usata per gli insetti può sembrare azzardata se tali formazioni si volessero omologare ai capillari dei Vertebrati in cui il sangue porta contemporaneamente tutti i materiali del metabolismo, ossigeno compreso, e in cui la parete dei capillari ha una struttura cellulare tipica con tipica avventizia reticolare. Ma intesa la parola come sistema di tubi sottilissimi decorrenti fra gli elementi del complesso neurosecretore e trasportanti sostanze, tale parola acquista un significato più particolare.

In definitiva il sistema da noi messo in evidenza potrebbe essere interpretato dai seguenti punti di vista:

1°) come un sistema di canalicoli interstiziali formanti una rete attorno a cellule nervose del cerebro e provvisti di una parete che dà reazione positiva coll'acido perjodico e col bleu di anilina. Esso si inizierebbe all'interno del cerebro come un sistema di drenaggio avviante il neurosecreto verso i corpi cardiaci, alla stessa guisa dei canalicoli biliari del fegato degli animali superiori, che, interstiziali alla loro origine entro i lobuli epatici, convogliano il loro secreto verso i canali biliari provvisti di una parete istologicamente ben definita. La positività della colorazione Masson e perjodica potrebbe indicare la presenza di sostanza collagena o collageno-simile, e tutto il complesso neurosecretore potrebbe considerarsi come una grossa ghiandola provvista di vasi conducenti il secreto ai corpi cardiaci.

2°) Le colorazioni positive di cui sopra indicherebbero nel cerebro semplicemente la presenza di collageno interstiziale non formante una vera parete di canalicoli. In tal caso il cerebro degli insetti rappresenterebbe un'eccezione poichè è noto che collageno interstiziale manca nei centri nervosi degli altri animali.

3°) Il sistema dei capillari del complesso neurosecretore deriverebbe dalla suddivisione di vasi emolinfatici penetranti nella scatola cranica e accompagnati da trachee. Tali vasi servirebbero contemporaneamente alle esigenze trofiche delle cellule neurosecretrici e al trasporto del loro neurosecreto.

RIASSUNTO

Gli A. A. dimostrano la presenza di un sistema capillare nel sistema neurosecretore di *Musca domestica* e *Calliphora erythrocephala*, e ritengono che il neurosecreto e il secreto del corpo cardiaco, penetrando nei capillari, raggiungano l'aorta. Entro il corpo cardiaco le fibre dei nervi cardiaci mostrano granulazioni che si colorano con l'ematossilina cromica Gomori e piccole masse paragonabili agli *herring-bodies* dei Vertebrati. I capillari aderiscono strettamente alle fibre dei nervi cardiaci, e il loro

contenuto è di color nero fumo con la colorazione Gomori. I capillari circondano le cellule del corpo cardiaco e le cellule neurosecretrici della *pars intercerebralis* e altre cellule nervose. La colorazione tricromica Masson e quella con l'acido perjodico di Lillie e Mc Manus dimostrano la presenza di una parete (collegeno?) di questi capillari, la cui rete è strettamente connessa col sistema tracheale.

SUMMARY

The A. A. attest the presence of a capillary system within the neurosecretory system of *Musca domestca* and *Calliphora erythrorcecphala;* it is possible that the neurosecretory substance and the secretion of *corpus cardiacum* give off into the capillaries reaching the aorta. Within the *corpus cardiacum* the fibres of the cardiac nerves show granules stained with Gomori's chrome-alum hematoxylin and little masses comparable to the herringbodies of the Vertebrates; the capillaries closely adhere to the fibres of the cardiac nerves and their content is smoke-black (Gomori stained). The capillaries surround the cells of the *corpus cardiacum* and the *corpus cardiacum* and the nervous cells of the *pars intercerebralis* and of other centers of the cerebrum. The Massons's trichrome stain and the Mc Mannus - Lillie perjodic acid stain demonstrate the presence of a (collagene?) wall of these capillaries. The capillary neck is closely connected with the tracheal system.

BIBLIOGRAFIA

1) Baccolo S. (1954): Il sistema stomatogastrico nella larva di *Calliphora erythrocephala* Meig. *Boll Zool. Agr. e Bachicol., 20,* 87-95.

2) De Lerma B. (1954): Osservazioni sulla neurosecrezione in *Hydrous piceus* L. (Coleotteri). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 24 suppl.,* 56-58.

3) Gabe M. (1954): La neuro-sécrétion chez les invertébrés. *Ann. Biol., 30,* 5-62.

4) Grandi G. (1951): Introduzione allo studio dell'entomologia. *1,* 27-30.

5) Grandori L. (1954): Anello di Weismann e neurosecrezioni in *Calliphora erythrocephala* Meig. e *Musca domestica* L. *Boll. Zoll. Agr. e Bachicol.,* XX, 51-59.

6) Grandori L. (1954): Esistenza di una rete capillare nel complesso neuro-endocrino di *Musca domestica* L. e *Calliphora erythrocephala* Meig. *Boll. Zool. Agr. e Bachicol.* XX, 83-86.

7) Grandori L. e Carè E. (1954): Studio anatomo-istologico sul sistema neurosecretore in *Musca domestica* e *Calliphora erythrocephala. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 24 suppl.,* 50-51.

8) Hanstrom B. (1953: The hypophysis in a wallaby, two tree-shrews, a marmoset, and an orang-utan. *Arkiv f. Zool., 6,* 97-154.

9) Matsumoto K. (1954): Neurosecretion in the thoracic ganglion of the crab, *Eriocheir japonicus. Biol. Bull., 106,* 60-68.

10) Richards A. G. (1941): Mode of action, petroleum oils, *Culex* (Diptera). *Trans. Ent. Soc. Amer., 67,* 161-196.

11) Richards A. G. (1943): Lipid nerve sheaths and insecticide action. *Jour. New York Ent. Soc., 51,* 55-69.

12) Scharrer B. (1941a): Neurosecretion II. Neurosecretory cells in the central nervous system of cockroaches. *J. Comp. Neur., 74,* 93-108.

13) Thomsen E. (1952): Functional significance of the neuro-secretory brain cells and the *corpus cardiacum* in the female blow-fly *Calliphora erythrocephala* Meig. *J. exp. Biol., 29,* 137-172.

14) Thomsen E. (1954): Experimental evidence for the transport of secretory material in the axons of the neurosecretory cells of *Calliphora erythrocephala* Meig. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 24 suppl.,* 48-49.

15) Thomsen M. (1954): Observations on the cytology of neurosecretion in various insects (Diptera and Hymenoptera). *Pubb. Staz. Zool. Napoli 24 suppl.,* 46-47.

16) Wigglesworth V. B. (1954): Growth and Regeneration in the Tracheal System of an Insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. Jour. Micr. Sci., 95,* 115-137.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

PATHOLOGICAL CHANGES PRODUCED BY *PLASMODIUM BERGHEI* IN RESISTANT AND NON-RESISTANT STRAINS OF MICE

BENJAMIN HIGHMAN, (*) JOSEPH GREENBERG, (**)
and G. ROBERT COATNEY (**)

Because of the possible importance of *Plasmodium berghei* in chemotherapeutic studies of malaria, the course of the blood-induced infection in the white Swiss strain of the mouse, *Mus musculus*, was investigated in this laboratory (MERCADO and COATNEY, 1951). Infected white mice died in 7 to 14 days, but certain hybrid mice (for instance, C57 Leaden x A, LAF), it was found subsequently (GREENBERG, NADEL, and COATNEY, 1954), died 9 to 26 days after inoculation. The present study is concerned chiefly with the histopathological changes found in these two strains of mice following inoculation with *Plasmodium berghei*.

MATERIALS AND METHODS

The Kasapa strain of *Plasmodium berghei* used in these investigations was furnished us through the kindness of Dr. I. H. VINCKE of Elizabethville, Belgian Congo, and has been maintained in the Laboratory of Tropical Diseases by weekly blood passage in general-purpose white Swiss mice.

White Swiss mice and LAF mice of both sexes were selected in lots from stock maintained at the National Institutes of Health. Each mouse received approximately 1 million parasitized red blood cells intravenously. LAF mice and one lot of 29 Swiss mice were inoculated at approximately 2 months of age; another lot of 26 Swiss mice was inoculated at weaning time at approximately 21 days of age.

As shown in Table 1, histopathologic studies were made on 11 uninoculated

---

(*) *National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases.*
(**) *National Microbiological Institute, National Institutes of Health, Public Health Service, Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda, Maryland.*

control animals and on 85 infected mice that were killed or died at varying intervals after inoculation; this includes 13 Swiss mice that died 7 to 8 days after inoculation and one LAF mouse that died on the twenty-third day.

TABLE 1

Age of infection in mice studied histopathologically

Day after inoculation	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	13-16	17-20	22-24	Total	Controls
No. of white mice. .	6	9	11	29	0	0	0	0	55	4
No. of LAF mice . .	4	3	4	2	3	4	4	6	30	7

The organs of 86 animals were fixed in a 10 per cent buffered (pH 7) solution of formalin; after fixation, the bones were decalcified in 5 per cent formic acid. Following routine procedures, paraffin section, (6 microns) were prepared and stained with buffered hematoxylin azure eosinate. Acidulated potassium ferrocyanide was used to demonstrate hemosiderin. Frozen sections of the heart, liver, kidney, and, in some instances, the adrenal were stained for fat with oil red 0 (LILLIE, 1954). The organs of six infected animals and four controls were fixed in Zenker's solution, and routine paraffin section were stained with hematoxylin and eosin.

Histopathologic studies were supplemented by studies of blood smears and touch and smear preparations made from various organs of some of the infected mice and stained with buffered Giemsa (pH 7.0). Better preparations resulted when the tissue juices were mixed, before spreading on the slide, with serum (rabbit or rat) freshly diluted with 3 volumes of distilled water (ALTLAND and HIGHMAN, 1954). These techniques aided greatly in elucidating the histopatho logic findings.

EXPERIMENTAL FINDINGS

Blood Smears.

The rate of development and the severity of the parasitemia was much greater in the Swiss mice, none of which survived more than 8 days. In these mice, a mean of 7 per cent of the erythrocytes were parasitized 3 days after inoculation, and 58 to 84 per cent 6 to 8 days after inoculation. In the LAF mice, only 22 to 26 per cent were parasitized 5 to 8 days after inoculation, and only 40 to 60 percent even in late infections (13 to 24 days after inoculation).

The blood smears in late infections revealed many immature erythrocytes (WINTROBE, 1951). The immature cells varied markedly in size and shape; their

mean diameter was greatly increased, often exceeding twice that of a mature erythrocyte (Figures 1 and 2). The majority had a diffusely basophilic cytoplasm which stained blue with Giemsa; others had a polychromatophilic cytoplasm showing various shades of basophilic cytoplasm intermingled with pink staining portions or presenting a diffusely basophilic cytoplasm with a brownish tinge.

In LAF mice killed 13 to 24 days after inoculation, 35 to 56 per cent of the erythrocytes were immature; less than 3 per cent were immature in Swiss and in LAF mice 5 to 8 days after inoculation. In general, over 90 per cent of the immature cells were parasitized and over 80 per cent contained more than one parasite. In contrast, only a mean of 24 per cent of the mature erythrocytes in LAF mice were parasitized in early infections (6 to 8 days after inoculation) and only 12 per cent in late infections (13 to 24 days). The parasites were morphologically similar to those in mature erythrocytes, but generally exhibited a more deeply basophilic cytoplasm and contained no pigment. Occasionally, a few fine pigment granules were seen in parasites harbored by polychromatophilic cells. Smears also revealed a variable number of fragmented or distorted parasitized cells and greatly enlarged cells with unstained or very pale cytoplasm. There were a variable number of extracellular, or free, pigmented and nonpigmented parasites. Some of the large extracellular schizonts could not be distinguished from intracellular forms which almost completely filled the corpuscle.

Large mononuclear cells often contained abundant brown pigment granules or masses, and occasionally one or more parasites (Figure 1), parasitized erythrocytes or large vacuoles similar to erythrocytes in size and shape. Neutrophils and lymphocytes contained pigment only occasionally and rarely showed one or more smudgy basophilic bodies in the cytoplasm suggesting Döhle bodies or degenerating merozoites. The nuclei of the white cells, particularly of the neutrophils, often showed focal condensations of the chromatin or diffusely altered or uneven staining of the chromatin material suggesting a toxic reaction.

Tissue Smears.

Tissue smears and touch preparations were made from the lung, liver, spleen, kidney, brain, and bone marrow. They revealed many pigmented and nonpigmented parasites, as described above, in normal and immature erythrocytes, respectively, as well as extra-cellular free forms. Many large mononuclear cells, Kupffer cells, and reticulo-endothelial cells of other organs contained pigment, and a few contained parasitized red cells or parasites in various stages of development (Figure 2). Some parasites were well preserved with clearly outlined reddish chromatin masses. Other were poorly stained and graded into smudgy basophilic inclusions or vacuoles. No parasites were clearly

identified in hematopoietic cells of the bone marrow or spleen, or, in the liver cells or parenchymal cells of other organs. Occasional parasites appeared to lie within capillary endothelial cells in the brain of Swiss mice killed 7 or 8 days after inoculation (Figures 3 and 4).

Histopathologic Findings

The principal findings and the usual time of their appearance are shown in Table 2. The onset and severity of the findings varied somewhat in different

TABLE 2

Time of appearance of various histopathologic changes in mice following intravenous injection of Plasmodium berghei

Histopatologic Changes	Day of onset	
	Swiss	LAF
Deposits of malaria pigment	3	4
Fatty changes in liver	4	6
Fatty changes in kidney	5	6
Fatty changes in heart	7	8*
Fatty depletion of adrenal	6	**
Increased hematopoiesis spleen	7	7
Hemosiderosis of kidney	6	6
Focal necrosis of liver	6	10
Focal necrosis of heart	—	17

(*) not present after 10 days
(**) not studied

animals. In general, however, the lesions were more severe in weanling Swiss mice than in those inoculated at two months, and were less severe in the LAF mice.

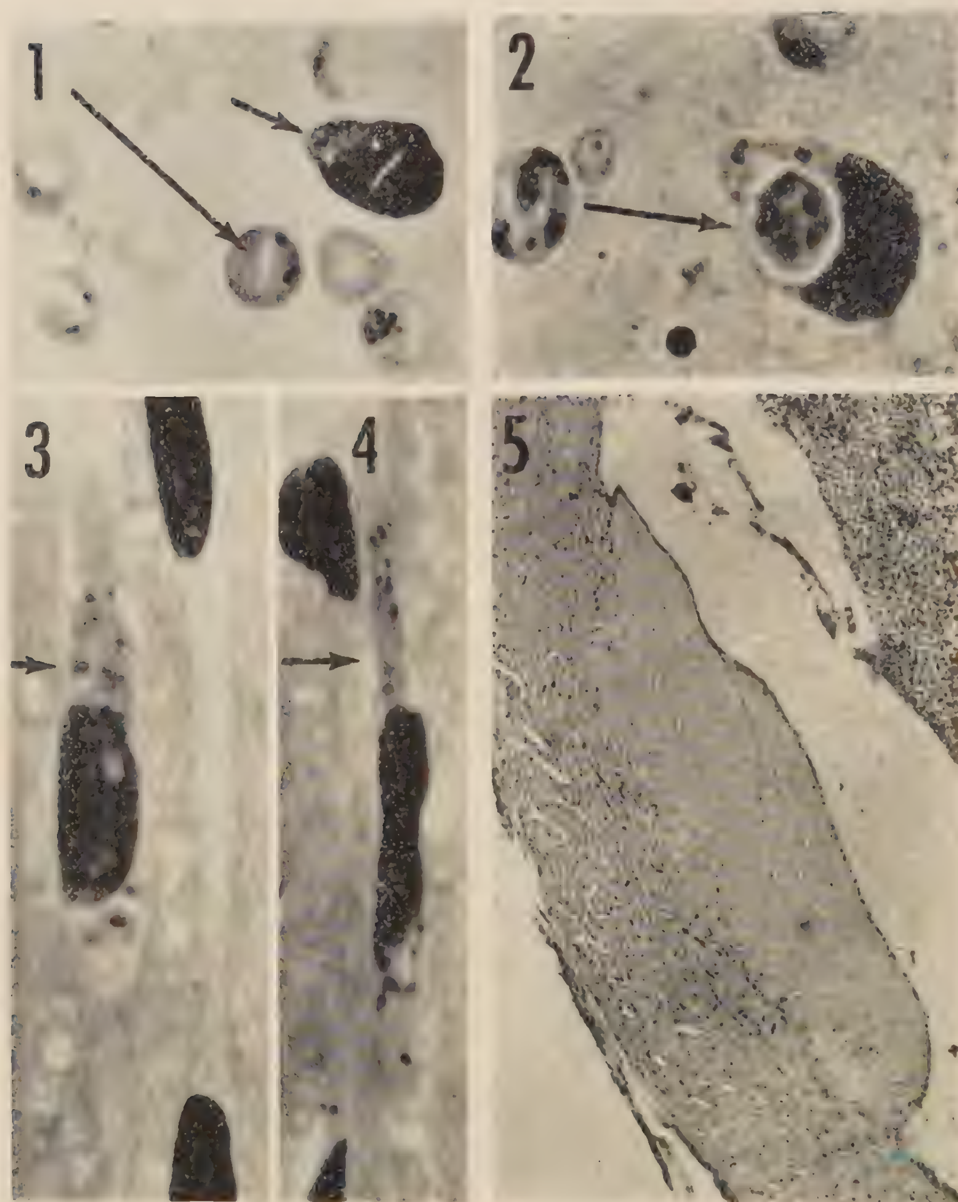
Parasites — In early infections, most of the parasites were endoerythrocytic pigmented forms, but in later infections there was a marked rise in the proportion of non-pigmented forms. Most of these latter parasites were in immature erythrocytes in the blood vessels. In sections, these cells were often irregular in shape, much larger than normal erythrocytes, and stained purple-violet instead of orange-red with azure eosinate. Parasitized, immature erythrocytes were particularly numerous in the capillaries of the renal glomeruli and alveolar septa. There were occasional extravasated or displaced parasitized erythrocytes lying outside the vessels. In collapsed capillaries, it was

often difficult to determine whether a large schizont filled an erythrocyte compressed against the capillarly wall or lay within the cytoplasm of a capillary endothelial cell. There were a few non-pigmented parasites that appeared to lie in alveolar septal cells, in Kupffer cells in the liver, in capillary endothelial cells in the brain, and in reticulo-endothelial cells in other organs. No exoerythrocytic forms were seen in the liver cells or the parenchymal cells of other organs. A few extracellular or free parasites were seen in the lumen of vessels and, rarely, apparently between parenchymal cells. It was often difficult to distinguish such forms from large schizonts in extravasated erythrocytes.

Pigment — The pigment deposits increased in amount with age of infection, and after the sixth day imparted a slate gray color to the liver and spleen grossly. The pigment was yellow brown at first, changing to dark brown and black as the size of the aggregates increased. Pigment granules were seen in Kupffer cells, in the reticulo-endothelial cells of the bone marrow and of the red pulp of the spleen, in alveolar septal cells, in phagocytes between renal tubules and myocardial fibers, in capillary endothelial cells of all organs studied, and in intravascular and extravascular large mononuclear cells.

Fatty changes — Fatty changes were more severe in the Swiss mice. In some instances, small to medium-sized droplets of fat were seen in nearly all the liver cells, in the epithelial cells of nearly all the convoluted tubules of the kidney, and in the outer epithelium of Bowman's capsule of many renal glomeruli. Minute fat droplets were seen in the muscle fibers throughout the myocardium or in patchy areas. As will be pointed out later, it is noteworthy that no fatty changes were seen in the heart after 10 days. In the adrenal, the amount of lipoid was reduced throughout the cortex, particularly in the zona fasciculata. The zona reticularis even in the control mice contained little fat.

Other changes during first 8 days. — Except for slight swelling of the vascular endothelium and the presence of pigment, parasites and other changes described above, no significant findings were noted during the first five days after inoculation. On and after the sixth day, moderate deposits of hemosiderin were noted in the convoluted tubules of the kidney. In the liver, there were a few small focal and periportal accumulations of cells, consisting chiefly of large pale mononuclear cells and lymphoid cells grading into hematopoietic cells. After the sixth day, the changes in the liver and kidney became more marked. In addition, the animals showed splenomegaly and an increase in hematopoiesis in both the spleen and bone marrow. The hearts of a few animals showed small interstitial collections of mononuclear cells. The brain showed hyaline thrombi in occasional small blood vessels, and one Swiss mouse killed 8 days after inoculation showed several recent hemorrhages in the white



Figures 1. - Blood smear of Swiss mouse 8 days after inoculation with *P. berghei.* Upper arrow shows non-pigmented parasite in white blood cell. Lower arrow indicates parasitized immature erythrocyte. Note parasites in mature erythrocytes and one disintegrating erythrocyte above and one below stem of lower arrow. X 3000.

Figure 2. - Touch preparation of liver of Swiss mouse killed 8 days after inoculation with *P. berghei.* Arrow shows parasitized immature erythrocyte lying in a phagocyte; in the cytoplasm of the phagocyte above the erythrocyte are several dark granules of

matter of the cerebellum. A few Swiss mice showed slight pulmonary edema and one or more small foci of coagulation necrosis in the liver.

Changes after 8 days (only LAF mice). — The hearts of half the animals killed on and after 17 days presented one or more areas of myocardial necrosis bordering one of the cardiac chambers. These foci were usually covered by an organizing thrombus (Figure 5). The liver of a few revealed some scattered foci of coagulation necrosis. The lungs showed marked swelling of the septal cells, edema of the alveolar septa in some areas, and edema fluid in some groups of subpleural alveoli. The brain of one animal killed 20 days after inoculation showed several small abscesses in the cerebral gray matter; no glial nodules or malaria granulomas such as occur in human malaria were found.

Discussion

Our study of blood smears extends the findings of others (see Thurston, 1953) that at certain stages in the infection and in certain strains of mice, *Plasmodium berghei* is found preponderantly in immature erythrocytes. The percentage of immature erythrocytes increased with age of infection and constituted nearly half of the total erythrocytes in animals surviving more than 2 weeks.Nearly all of these immature cells contained one or more parasites, while the percentage of parasitized, and particularly polyparasitized, mature red cells declined in late infections. This decline may be due (1) to an increased immunity of the mature erythrocytes, (2) to the destruction and therefore depletion of the more susceptible erythrocytes, or (3) to the preferential destruction of infected mature erythrocytes.

The lack of malaria pigment, a hemoglobin derivative, in parasitized immature erythrocytes is not surprising since these cells contain much less hemoglobin than mature erythrocytes. Some of the parasitized immature erythrocytes had very pale blue cytoplasm suggesting that the parasites utilize the basophilic substance, probably ribonucleoproteins (Wintrobe, 1951), of these cells. Perhaps the metabolism of the parasites in immature erythrocytes is altered so that they are subsequently less able to thrive in cells containing much hemoglobin.

Van den Berghe, Vincke, and Chardome (1950) reported the presence of schizonts in reticulo-endothelial cells of mice inoculated with *P. berghei*. They

malaria pigment. Note the parasitized immature erythrocyte to the left and the mature parasitized erythrocyte above base of arrow. X 3000.

Figures 3 and 4 - Brain smear of Swiss mouse killed 8 days after inoculation with *P. berghei*. Arrows indicate nonpigmented parasites apparently lying within capillary endothelial cells. X 3000.

Figure 5. - Section of right ventricle showing organizing mural vegetation in LAF mouse killed 17 days after inoculation with *P. berghei*. X 80.

had more basophilic cytoplasm and slightly larger and more numerous merozoites than those in the blood. We found similar forms in occasional large mononuclear cells of the blood and in Kupffer cells and reticulo-endothelial cells of other organs. However, we could not distinguish them from non-pigmented schizonts seen in immature erythrocytes and occasionally extracellularly in the circulating blood. Many of the phagocytes contained some brown pigment granules in their cytoplasm adjoining the parasite (Figure 2), indicating that the latter may have contained and released some pigment. Some of these reticulo-endothelial parasites were poorly stained and preserved, indicating that they were being destroyed by the phagocytes. Others were well preserved. Accordingly it is possible as suggested by VAN DEN BERGHE, VINCKE, and CHARDOME (1950), that under certain conditions the parasites in the phagocytes may be able to complete their development and release merozoites capable of invading other reticulo-endothelial cells or erythrocytes.

Studies have revealed that *P. berghei* infections may become refractory to certain drugs (see THURSTON, 1953). There is evidence in experimental bacterial endocarditis (HIGHMAN, ALTLAND, and EAGLE, 1954) that streptococci in macrophages are relatively resistant to penicillin therapy (because their metabolism is depressed) and may be responsible for relapses. Perhaps, in a similar manner, reticulo-endothelial parasites may be responsible for therapeutic resistance and treatment failures in malaria. Their number appeared too small to account for the death of our experimental animals. We did not find, despite a prolonged search, any tissue forms in the liver cells or other parenchymal cells resembling those described in primates (SHORTT and GARNHAM, 1948).

Non-pigmented parasites have been described by VAN DEN BERGHE, VINCKE, and CHARDOME (1950), in vascular endothelial cells. We have found similar appearing cells in capillary endothelial cells in brain smears. The parasites closely resembled those seen in immature erythrocytes lying within the lumen of such capillaries. Because such cells, as noted in brain smears, were often much larger than normal cells, and were frequently elongated, distorted, compressed against or partially superimposed on adjoining endothelial cells, the possibility could not be ruled out entirely that parasites appearing to lie in endothelial cells may actually have been lying within superimposed immature erythrocytes; in a few instances, it appeared probable that parasites were within endothelial cells.

The histopathologic changes may be attributed to the severe parasitemia and the severe secondary anemia and toxemia. The anemia was due largely to rapid destruction of the red blood cells. This destruction was evidenced by the occurrence of fragmented erythrocytes in peripheral blood smears, widespread deposits of malaria pigment, and heavy deposits of hemosiderin in the renal tubules (DUNN, 1949). Stimulation of erythropoiesis was indicated by an

increasing number of immature erythrocytes in the peripheral blood and by an increase in erythropoietic cells noted in sections of the bone marrow and spleen.

Fatty changes in the viscera similar to those reported here have been produced by various toxic compounds (HIGHMAN, HEPPEL, and LAMPREY, 1951) as well as by hypoxia (HIGHMAN and ALTLAND, 1949). In our animals, fatty changes were first noted at 4 to 6 days after inoculation; after 10 days, fatty changes were no longer noted in the heart, indicating a lessening in toxemia (HIGHMAN, HEPPEL, and LAMPREY, 1951). This period (4 to 10 days after inoculation) corresponds with a rapid fall in erythrocyte count (MERCADO and COATNEY, 1951). This suggests that the fatty changes are due to toxemia associated with rapid destruction of red blood cells rather than to hypoxia resulting from anemia, since anemia continues unabated after 10 days (MERCADO and COATNEY, 1951). On the other hand, hypoxia may be largely responsible for the foci of necrosis in the liver and the degenerative changes in the myocardium associated with the organizing thrombi, since these lesions were not noted in LAF mice during the first week after inoculation. Hepatic necrosis in acute malaria in man has been attributed similarly to hypoxia (ANDREWS, 1948). Myocardial damage and organizing vegetations have been produced in rats by hypoxia resulting from daily 4-hour exposures in a low pressure chamber to a simulated high altitude (HIGHMAN and ALTLAND, 1949).

Death of the Swiss mice within 8 days could be attributed largely to the severe toxemia due to rapid hemolysis; this was evidenced histologically by the severe renal hemosiderosis and visceral fatty changes. Also, it is possible that death could be attributed to shock following the rapid destruction of erythrocytes. The longer survival of the LAF mice may be due to a less severe toxemia due to a slower rate of blood destruction; this was evidenced by less severe histologic changes. Death of LAF mice after 3 weeks may be attributed largely to the prolonged hypoxia resulting from increasing anemia as well as the prolonged, even though milder, toxemia. Perhaps blockage of some capillaries, particularly in the renal glomeruli and in the brain by hyaline thrombi and parasitized immature erythrocytes may be an additional contributing factor, although no significant histologic changes attributable to circulatory stasis were found in these organs. Further studies are needed to determine if a greater length of survival of certain strains of mice may be due to a greater natural resistance to the parasite, a greater tolerance to hypoxia or to other innate characteristics.

SUMMARY

The course of *Plasmodium berghei* infections was followed in white Swiss mice and LAF mice inoculated intravenously with one million parasitized red blood cells. The infected Swiss mice rarely survived more than eight days after inoculation, while most of the LAF mice survived more than three weeks. Blood smears and tissue smears and touch preparations were examined at intervals after inoculation Histopathologic studies were made on 55 Swiss and 30 LAF infected mice.

The infected animals developed a progressive parasitemia reaching 84 per cent in Swisse mice and 60 per cent in the LAF mice. The parasites showed a marked predilection for immature erythrocytes. Non-pigmented schizonts were found in these immature red blood cells and occasionally in circulating mononuclear cells, Kupffer cells, and reticulo-endothelial cells in other organs. No tissue forms were found in liver cells. During the first week, the infected animals developed widespread deposits of malaria pigment, marked fatty changes in the viscera, and hemosiderosis of the kidney. After the first week, some of the LAF mice developed focal areas of necrosis in the liver and vegetations in the heart. The significance of the histopathologic changes is discussed.

RIASSUNTO

Infezioni di *P. berghei* sono state seguite in topini bianchi dei ceppi Swiss e LAF inoculati per via endovenosa con un milione di eritrociti parassitati. I topini Swiss infetti, raramente hanno sopravvissuto oltre gli otto giorni dall'inoculazione, mentre la maggior parte dei topini LAF sopravvissero per più di tre settimane. Strisci di sangue e di organi, e impronte di organi, furono esaminati a intervalli dopo l'inoculazione. Studi istopatologici furono eseguiti su 55 topini Swiss a 30 LAF infetti.

Gli animali infetti sviluppano una parassitemia progressiva che raggiunse l'84% nei topini Swiss ed il 60% nei LAF. I parassiti mostrarono una predilezione spiccata verso gli eritrociti immaturi. Schizonti apigmentati furono repertati in queste cellule immature ed occasionali in cellule mononucleate in circolo, in cellule di Kupffer ed in cellule reticolo-endoteliali in altri organi. Non furono osservate forme tissulari nelle cellule del fegato. Durante la prima settimana, gli animali infetti svilupparono diffusi depositi di pigmenti malarici, marcate alterazioni del grasso dei visceri ed emosiderosi del rene. Dopo la prima settimana alcuni dei topini LAF svilupparono foci di necrosi epatica e proliferazioni nel cuore. Viene discusso il significato di queste alterazioni istopatologiche.

BIBLIOGRAPHY

ALTLAND, P. D. and HIGHMAN, B. (1954): Effect of a folic acid antagonist (9-methyl PGA) upon rats exposed to high altitudes. *Am. J. Physiol.*, *176*, 1-5.

ANDREWS, W. H. H. (1948): The liver lesions in malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, *41*, 699-704.

DUNN, T. B. (1949): Some observations on the normal and pathologic anatomy of the kidney of the mouse. *J. Nat. Cancer Inst.*, *9*, 285-302.

GREENBERG, J., NADEL, E. M., and COATNEY, G. R. (1954): Differences in survival of several inbred strains of mice and their hybrids infected with *Plasmodium berghei*. *J. Infect. Dis. 95*, 114-116.

HIGHMAN, B. and ALTLAND, P. D. (1949): Acclimatization response and pathologic changes in rats at an altitude of 25,000 feet. *Arch. Path.*, *48*, 503-515.

HIGHMAN, B., HEPPEL, L. A., and LAMPREY, R. J. (1951): The toxicology of 1,2-dichloroethane (ethylene dichloride) V. Effect of protective agents on visceral fatty changes in exposed rats. *A. M. A. Arch. Path.*, *51*, 346-350.

HIGHMAN, B., ALTLAND, P. D., and EAGLE, H. (1954): Experimental bacterial endocarditis in altitude rats. Development and regression of cardiac lesions in including rats treated with penicillin. *A. M. A. Arch. Path.* *58*, 241-257.

LILLIE, R. D. (1954): Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. The Blakiston Company, New York, 501 pp.

MERCADO, T. I. and COATNEY, G. R. (1951): The course of the blood-induced *Plasmodium berghei* infection in white mice. *J. Parasitol.*, *37*, 479-482.

SHORTT, H. E. and GARNHAM, P. C. C. (1948): The exoerythrocytic parasites of *Plasmodium cynomolgi*. *Trans Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, *41*, 705-716.

THURSTON, J. P. (1953): *Plasmodium berghei*. *Parasitological Reviews*, *2*, 311-332.

VAN DEN BERGHE, L., VINCKE, I., and CHARDOME, M. (1950): La phase tissulaire de *Plasmodium berghei*. Ann. Soc. Belge de Med. Trop., *30*, 79-82.

WINTROBE, M. M. (1951): Clinical Hematology, third ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1048 pp.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SCHISTOSOMIASIS JAPONICA AMONG DOMESTIC ANIMALS IN FORMOSA (*)

H. F. HSU (**), S. Y. LI HSU (**) and K. Y. CHU (***)
(With the Technical Assistance of T. C. HUANG, C. T. TSAI and Y. W. WANG (****))

Schistosoma japonicum in Formosa was first discovered by TAKEGAMI (1914) in the portal vein of a pig from the village of Lienchiaotso, Changhua *hsien*. He estimated that in the two closely situated villages, Lienchiaotso and Hsiaopuhsin, more than 70 per cent of the pigs were positive for this parasite. Later on, TAKEGAMI and his colleagues (TAKEGAMI et al, 1914; TAKEGAMI, 1915) found that this parasite was present in pigs, dogs oxen and water buffaloes in 18 villages in the Changhua area. However, the incidence of the parasite among various species of domestic animals in this area was not determined by them. Since it is highly possible that in Formosa *S. japonicum* is a non-human strain (Hsü and Hsü, Manuscript), it seems necessary to investigate more fully the incidence of this infection in the domestic animals on this island.

METHOD AND PROCEDURE

Dogs. Street dogs were caught in various villages in the Changhua endemic area, where previous study showed the presence of infected oncomelanian snails (Hsü et al, 1952). Altogether 100 dogs were obtained from 30 villages. The number of dogs obtained from each village varied from 1 to 11. They were

---

(*) This investigation was supported by a research grant, E-228 (C), T. M. (1), National Microbiological Institute, of the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service.

(**) *Department of Hygiene and Preventive Medicine, State University of Iowa and Iowa State Hygienic Laboratory.*

(***) Lecturer, *Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Formosa.*

(****) All technical experts of the *Chinese National Institute of Health, Taipei, Formosa.*

killed in our field laboratory and examined for schistosomiasis according to the following procedure: mesenteric veins and the portal vein and its branches in the liver were examined manually for the worms; stools from the rectum or large intestine were examined either by sedimentation, acid-ether, or egg hatching method for ova or miracidia; and livers were examined for ova by the 10 per cent KOH digestion method.

Water buffaloes. Pratically all the bovine animals in this endemic area are water buffaloes. Very rarely is an ox seen. The animals for our examinations were from two sources: from the slaughterhouse at Chihu *chen* and from the farm houses of various villages. The farmers in this area keep water buffaloes mainly for the plowing of the fields, consequently the animal is killed rarely for meat consumption; only 18 slaughterhouse animals were examined by us. The first five animals were examined only by the method of stool sedimentation. As the water buffalo's feces usually showed the presence of much fine sand in the sediment, we had to abandon this procedure and used either the hatching method or the KOH liver digestion method for the remainder.

On the farms, fresh animal feces were obtained from the house stables. For each animal, three stools were secured. The examinations were first done by the sedimentation method and later on, the egg hatching method was substituted. The proctoscopic biopsy method was also used for diagnosis but, as the farmers in this area opposed proctoscopic examination of their animals, only 27 were examined by this method.

Goats. The source of the animals and the procedure were the same for goats as for water buffaloes.

Pigs. The method for examination of pigs was the same as for water buffaloes and goats except that no proctoscopic biopsy was done for pigs because the farmers did not favor the use of this technique on their costly animals.

Results of examination

Dogs. The results of examinations as shown in Tables 1 and 2 indicate that 62 of 100 dogs (62 per cent) from 11 villages were positive for schistosomiasis and in the village of Sansheng, all the 11 dogs examined were positive for this disease. Among the positive dogs, the KOH liver digestion method revealed 100 per cent of the infected animals, e. g., 62 dogs, whereas with the manual worm-finding method, only 74.2 per cent were found and stool examination discovered 64 per cent.

As stools from all the dogs were not examined simultaneously by sedimentation, acid-ether, and egg hatching methods, it is impossible for us to compare the efficiency of these methods. However, there were 10 dogs whose stools were examined simultaneously by the sedimentation and egg hatching methods and

the results indicated that among them, 2 were found positive by the sedimentation method whereas 8 were positive by hatching method. Accordingly, if only stools can be used for diagnosis, the hatching method seems to be superior. On the other hand, our data indicated that all the above mentioned 10 dogs were found positive by the KOH liver digestion method. It shows, therefore, that if the materal from the whole dog is available for examination, the KOH liver digestion method is better than the other two methods.

TABLE 1.

Results of examination of dogs for schistosomiasis japonica in the Changhua endemic area, Formosa, September 5-23, 1952.

Villages (*)	No. Examined	No. Positive
Huatan	2	1
Kouchuang	1	0
Liutso	2	0
Nanwei	9	0
Chiukuan	3	0
Lutso	3	0
Massutso	4	3
Chenping	4	4
Wufeng	1	1
Hungkueiliao	2	2
Nientso	6	2
Fuhsing	2	2
Chiaotou	6	6
Fantso	2	2
Chinshui	3	3
Sansheng	11	11
Nanshihpu	8	5
Fantungpu	2	2
Haohsiu	1	1
Chiohsuchie	1	1
Talien	1	1
Hsinhsing	4	1
Tsengtsotso	2	2
Shanhsi	1	0
Chiangkantso	1	0
Tingliao	8	5
Shanliao	2	1
Chihu	3	1
Chutaotsu	3	3
Hsishihtso	2	2
Total (11)	100	62

(*) Location of these villages are referred to Fig. 6 in Hsü et al. 1952.

TABLE 2.

Result of methods of examination of dogs for schistosomiasis japonica in the Changhua endemic area, Formosa.

Method of Examination	No. Examined	No. Positive	Percentage Positive
Manual examination for worms in portal and mesenteric veins	100	46	46
KOH liver digestion method	100	62	62
Stool examination method	97	39	42.2
Combined Results	100	62	62

Water buffaloes. The results of our study on the schistosomiasis incidence of water buffaloes are shown in Table 3. The incidence of infection varied with the method of examination, e. g., from 0 to 27.3 per cent (average: 3.5). Because the various methods of examination were not done on the same animal, it was not possible to make a comparison of their efficiency. However, judging from the data as given in the table, we may say that the KOH liver digestion method should be regarded as the best method for the diagnosis of schistosomiasis in water buffaloes. Proctoscopic biopsy is also a good diagnostic method but it is difficult to obtain the farmers' permission for the procedure in this area. The hatching method is better than the sedimentation method because, as mentioned above, the former eliminates the difficulty arising from the presence of much fine sand in the feces.

The animals examined from the stables were from 13 villages. The number of animals examined from each village varied from 2 to 64. The positive cases we obtained in the course of our examinations were 1 of 44 at Peishihwei (sedimentation method), 1 of 2 at Toumentou (sedimetation method), 2 of 18 at Fanpo (hatching method), 2 of 64 at Tayu (hatching method) and 4 of 49 at Niuputso (hatching method). The incidence of infection of the animals in these 5 villages was, therefore, 2.3, 50 (*), 11.1, 3.1 and 8.2 per cent respectively.

(*) Only two animals were examined from this village, therefore, this inaccurate percentage is not used in the comparisons given in Table 7.

Table 3.

Results of examination of water buffaloes for schistosomiasis japonica in the Changhua endemic area, Formosa, from July 10, 1952 through July 18, 1953.

Source	Method of Examination	No. Examined	No. Positive	Percentage Positive
Slaughterhouse . . .	Stool sedimentation	5	0	0
» »	Stool: egg hatching . . .	2	0	0
» »	KOH liver digestion . . .	11	3	27.3
Farm Stables	Stool sedimentation	181	4	2.2
» »	Stool: egg hatching	229	6	2.7
» »	Proctoscopic biopsy	27	3	11.1
Total		455	16	3.5

Goats. The results of examination of goats are shown in Table 4. The incidence of infection obtained by various methods varies from 0 to 3.9 per cent (average: 1.7). The method of choice seems to be the KOH liver digestion method. The villages where positive goats were found were Tayu (1 of 30 or 3.3 per cent) and Peishihwei (1 of 14 or 7.1 per cent).

Table 4.

Results of examination of goats for schistosomiasis japonica in the Changhua endemic area, Formosa, from July 10, 1952 through July 18, 1953.

Source	Method of Examination	No. Examined	No. Positive	Percentage Positive
Slaughterhouse . . .	Stool sedimentation	24	0	0
» »	Stool: egg hatching . . .	21	0	0
» »	KOH liver digestion . . .	26	1	3.9
Farm Stables	Stool sedimentation	4	0	0
» »	Stool: egg hatching	82	2	2.4
» »	Proctoscopic biopsy	73	1	1.4
Total		230	4	1.7

Pigs. The results of examination of pigs for schistosomiasis japonica in the Changhua endemic area are shown in Tables 5 and 6. The incidence of infestion obtained by various methods of examination varied from 0 to 10.5 per cent (average: 2.6). In the examination of pigs from the slaughterhouse, the KOH liver digestion gave better results than either the sedimentation or egg hatching technique. A comparison was made of the KOH liver digestion and egg hatching methods in 126 pigs from the slaughterhouse. Five of these were positive by the former and all were negative by the latter. However, the highest incidence of infection (10.5 per cent) was found in stable animals, in which the hatching method was used. If we study examination results of animals from stables in the individual village, a still higher incidence of infection (26.6 per cent) was recorded for the pigs at Niuputso (Table 6). As Niuputso happened to be one of the heaviest endemic villages in this area, the incidence from such a village would certainly be very high whereas the incidence of infection of slaughterhouse animals encountered in villages of high and low endemicity would be lower than that of a single village of high endemicity. Bearing this fact in mind, we can readily understand why the highest incidence of infection was obtained in a particular village with the hatching method and not with the KOH liver digestion procedure although the latter has been shown to be better than the former in the diagnosis of animal schistosomiasis.

TABLE 5.

Results of examination of pigs for schistosomiasis japonica in the Changhua endemic area, Formosa, from July 10 through Nov. 14, 1952.

Source	Method of Examination	No. Examined	No. Positive	Percentage Positive
Slaughterhouse . . .	Stool sedimentation	602	0	0
» »	Stool: egg hatching . . .	228	0	0
» »	KOH liver digestion . . .	374	9	2.4
Farm Stables (*) . . .	Stool sedimentation	24	0	0
» »	Stool: egg hatching	294	31	10.5
Total		1,522	40	2.6

(*) See Table 6 for details.

TABLE 6.

Results of examination of pigs for schistosomiasis japonica in farm stables in the Changhua endemic area, Formosa, from September 19 through November 14, 1952.

Village	Method of Examination	No Examined	No. Positive	Percentage Positive
Wayao	Stool sedimentation	24	0	0
»	Stool: egg hatching . . .	50	0	0
Tayu	» » »	135	2	1.5
Niuputso	» » »	109	29	25.6
Total		318	31	9.7

Summary of Incidence. As all the animals were not examined by the same method throughout and were not from the same village, it is difficult to make a comparison of the incidence of infection among the different species of animals. However, if the above factors are not taken into consideration, the incidence of schistosomiasis infection of various species of domestic animals in the endemic area can be provisionally summarised for reference as given in Table 7. Dogs have the highest incidence of infection, followed in order of incidence by water buffaoles, pigs and goats.

TABLE 7.

Summary of the incidence of schistosomiasis japonica in domestic animals in the Changhua endemic area, Formosa, examined from July 10, 1952 through July 18, 1953.

Animal	No. Examined	Average Incidence (Per Cent)	Highest Incidence (Per Cent) Obtained by the Methods Used	Village of Highest Endemicity and Its Incidence of Infection (Per Cent)
Dog	100	62	62 (KOH liver digestion)	Sansheng: 100
Buffalo . . .	455	3.5	27.3 (KOH liver digestion)	Faupo: 11.1 (*)
Goat	230	1.7	3.9 (KOH liver digestion)	Peishihwei: 7.1
Pig	1,522	2.6	10.5 (Stool: egg hatching) (**)	Niuputso: 26.6
Total . . .	2,307	1.7-62	3.9-62	7.1-100

(*) See footnote given under the paragraph dealing with water buffaloes.
(**) The best method for obtaining the highest incidence, even for pigs, may also be the KOH liver digestion method as pointed out the previons paragraph.

DISCUSSION

Since it has been shown that the *Schistosoma japonicum* in Formosa is a non-human strain (Hsü and Hsü, Manuscript), the question of the normal definite host in this area arises. It is understood that a normal host should be a host which affords the best condition for the parasite to develop, to live and to propagate its progeny and at the same time this host species should show a high infection rate. So far as the latter condition is concerned, the dog seems to be the normal host of the Formosan *S. japonicum* strain. The question of whether this parasite will eventually be regarded as a canine strain can only be answered upon the completion of the study on the other factors given above.

As the incidence of *S. japonicum* infection in domestic animals often varies greatly with different method of examination, we should, whenever possible,

use the best method of examination in making a survey so that a true incidence can be obtained. The results of our study indicate that the KOH liver digestion method is the method of choice for such a study. If only stools can be obtained for examination, the hatching method is highly recommended.

The estimation of the incidence of *S. japonicum* infection of pigs in this area as « 70 per cent » as given by TAKEGAMI (1914) is not confirmed by the results of the present study. The highest incidence of infestion for pigs obtained by us was 26.6 per cent at the village of Niuputso. The villages where TAKEGAMI made his study were Lienchiaotso and Hsiaopuhsin. Before the present survey of the *S. japonicum* infection in the domestic animals was started, a preliminary survey of the incidence of *S. japonicum* infection in its intermediate host, *Oncomelania formosana,* had been done and the results showed that snails at Hsiaopuhsin were negative for *S. japonicum* infection and at Lienchiaotso no *Oncomelania* snails could be found. For this reason, we decided to make our examination of the domestic animals not in the above mentioned two villages but in the villages where the snails were found to have a high incidence of infection. We should have obtained a still higher incidence of *S. japonicum* infection in the pigs in our selected villages than in TAKEGAMI's two villages, Lienchiaotso and Hsiaopuhsin, but the results of examination showed the contrary to be true.

Taking into consideration the fact that TAKEGAMI's study was made 38 years ago and that farming conditions in the Changhua area have changed greatly in this period, we may find a reason to explain the above mentioned discrepancy. More land has been cultivated in the last 3 decades in this area and many irrigation ditches have been re-constructed. In recent years, almost all pigs are kept in pens in farm houses instead of roaming at large in the field. The chance for pigs to contact infected water in the irrigation ditches has accordingly been greatly reduced. This may be the reason why the incidence of *S. japonicum* infection of pigs in this endemic area becomes lower now than it was 38 years ago.

Domestic animals naturally infected with the human *S. japonicum* strain have been reported as follows: oxen, water buffaloes, dogs, cats, goats, sheep and horses on the Chinese mainland; oxen, cats, goats and horses in Japan; and water buffaloes, dogs, cats, goats, pigs and horses in the Philippines. As mentioned above, oxen, water buffaloes, dogs, goats and pigs are likewise infected by the non-human *S. japonicum* strain in Formosa. As there are neither sheep nor horses in this area, these animals were of no concern in the present study. It is regrettable that cats were not examined in the present study. For sake of completeness, the incidence of *S. japonicum* infection in cats should be investigated later on.

With the evidence that *S. japonicum* strains exist it was thought that it would be of interest to compare the reported incidence in domestic animals in

the various endemic areas of the Far East. A summary of this information on dogs, water buffaloes, goats and pigs has been presented in Table 8. It should be remembered that the authors listed used different methods in their examinations; that the care of the animals varied with the area involved; and that in some reports the number of animals examined was too small to give an accurate incidence. For these reasons it is impossible to make accurate comparisons at this time. It is believed that a careful study of this problem would be rewarding.

TABLE 8.

Incidence of S. j. infection of dogs, water buffaloes, goats ad pigs in various endemic areas in the Far East.

Animal	Author	Locality	No. Examined	No Positive	Percentage Positive
Dog	ANDREWS (1937)	Shanghai, China	590	4	0.68
	CHEN (1939)	Futsing, China	9	3	33
	WRIGHT et al (1947)	Yamanashi, Japan	353	176	49.9
	OKOSHI (1951)	Kofu, Japan	(*)	(*)	74.1
	OKABE & KOGA (1952)	Saga, Japan	365	(*)	2.7
	TAMIMATSU et al (1952)	Saga, Japan	214	42	19.6
	TUBANGUI & PASCO (1941)	Mindoro, P. I.	6	2	33.3
	HUNTER et al (1950)	Naujan, P. I.	14	8	5.7 (**)
	PESIGAN (1953)	Leyte, etc., P. I.	87	25	28.7
	Present authors	Formosa, China	100	62	62
Water buffalo	WU (1938)	Shanghai, China	406	76	18.7
	TUBANGUI & PASCO (1941)	Mindoro, P. I.	21	0	0
	HUNTER et al (1950)	Naujan, P. I.	6	1	16.7 (**)
	PESIGAN (1953)	Lano, etc., P. I.	111	6	5.4
	Present authors	Formosa, China	455	16	3.5
Goat	WU (1940)	Shanghai, China	196	16	8.1
	WRIGHT et al (1947)	Yamanashi, Japan	1,118	156	14.1
	Present authors	Formosa, China	230	4	1.7
Pig	WU & CHEN (1941)	Shangai, China	241	0	0
	TUBANGUI et PASCO (1941)	Mindoro, P. I.	6	3	50
	HUNTER et al (1950)	Naujan, P. I.	13	9	69.2(**)
	PESIGAN (1953)	Leyte, etc., P. I.	651	71	10.9
	Present authors	Formosa, China	1,522	40	2.6

(*) Number of animals not mentioned.
(**) Percentage calculated by us.

During their examinations of water buffaloes (carabao calves) at Naujan, the Philippines, HUNTER et al. (1950) reported that eggs of *S. japonicum* were recovered from the feces of one of the 6 carabao calves examined but these eggs did not hatch in 24 hours even though they appeared to be normal and contained viable miracidia. This observation is counter to our experience with the eggs obtained from water buffaloes in Formosa. They pointed out, furthermore, that water buffaloes on the Chinese mainland and Formosa belong to the species *Bubalus bubalis* (*Bos bubalis*) and those from the Philippines, *Bubalus mindorensis* (*Bos mindorensis*), so the appearance of apparently viable eggs in the stools of the Philippine species constituted a new record for *S. japonicum*. Information received from authoritative sources (*) indicates that *Bubalus mindorensis*, the tamarao, is a small, wild, fierce animal and when captured does not live long. There has been no record that it has been domesticated. The carabao used for plowing purpose in Mindoro and other parts of the Philippines are not *B. mindorensis* but *B. bubalis*.

SUMMARY

1. There is evidence that the *Schistosoma japonicum* in Formosa is a non-human strain. To determine the natural definite hosts of the endemic area, 100 dogs, 455 water buffaloes, 230 goats and 1,522 pigs were examined. The incidence of infection was found as follows: dogs: 62 per cent; water buffaloes: 3.5 per cent; goats: 1.7 per cent and pigs: 2.6 per cent.

2. As dogs have the highest incidence of infection, the possibility of regarding the non-human *S. japonicum* strain in Formosa as a canine strain is discussed.

3. In making a survey for the incidence of *S. japonicum* infection in domestic animals, the KOH liver digestion method was the most accurate. If only stool can be obtained for examination, the hatching method is highly recommended.

4. The apparent marked decrease in the incidence of *S. japonicum* infection in pigs over the past 38 years is probably due to changes in the methods used in the care of these animals.

5. The incidence of *S. japonicum* infection in dogs, water buffaloes, goats and pigs in various *S. japonicum* endemic areas in the Orient is tabulated and discussed.

RIASSUNTO

1) Esistono prove che lo *Schistosoma japonicum* a Formosa è un ceppo non umano. Per determinare l'ospite naturale definitivo nell'area endemica, sono stati esaminati 100 cani, 455 bufali d'acqua, 230 capre e 1522 suini. Fu trovata la seguente incidenza di infestazione: cani 62%; bufali d'acqua 3,5%; capre 1,7% e suini 2,6%.

2) Poichè i cani hanno la più alta incidenza d'infestazione, viene discussa la

(*) We wish to express our sincere appreciation to Dr. DAVID H. JOHNSON, Acting Curator, Division of Mammals, United States National Museum and to Dr. ARTURO REYES, Associate Professor of Epidemiology, Institute of Hygiene, University of the Philippines, for their information on the water buffaloes on Mindoro, P. I.

possibilità di considerare il ceppo non umano di *S. japonicum* in Formosa come un ceppo canino.

3) Nell'indagine per l'incidenza d'infestazione da *S. japonicum* negli animali domestici, il metodo migliore è quello della digestione del fegato con KOH. Se per l'esame sono disponibili le sole feci, è assai raccomandabile il metodo della schiusura.

4) L'apparente marcata diminuzione nell'incidenza d'infestazione da *S. japonicum* nei suini negli ultimi 38 anni, è probabilmente dovuta a cambiamenti nei metodi d'allevamento di questi animali.

5) Viene discussa l'incidenza d'infestazione da *S. japonicum* nei cani, nei bufali d'acqua, nelle capre e nei suini in diverse aree endemiche per *S. japonicum* nell'Oriente.

BIBLIOGRAPHY

ANDREWS, M. N. (1937): The helminthic parasites of dogs and cats in Shanghai, China. *J. Helminth.*, *15*, 145-152.

CHEN, K. C. (1939): Investigation of schistosomiasis japonica in Futsing *Nat. Med. J. China*, *25*, 83-96.

HSU, H. F. and HSÜ, S. Y. LI: Manuscript.

HSU, H. F., LI, S. Y., WANG, C. K., FAN, P. C., and HUANG, T. C. (1952): Studies on schistosomiasis japonica in Formosa. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, *1*, 287-301.

HUNTER, G. W. III, DILLAHUNT, J. A., and DALTON, H. C. (1950): The epidemiology of schistosomiasis japonica in the Philippine Islands and Japan. I. Surveys for schistosomiasis japonica on Mindoro, P. I. *Am. J. Trop Med.*, *30*, 411-429.

OKABE, K. and KOGA, Y. (1952): On the helminthic parasites of dogs in Saga Prefecture. *J. Kurume Med. Assn.*, *15* (9-10), 125-128.

OKOSHI, S. (1951): On schistosomiasis japonica in domestic animals. *Newest Veteri. Sc.*, 179-186 (In Japanese).

PESIGAN, T. P. (1953): The schistosomiasis problem in the Philippines: Its public health and other aspecs. *Santo Tomas J. Med.*, *8*, 1-22.

TAKEGAMI, K. (1914): On the "Schistosomidae" in Formosa (Preliminary report). *Formosan Agr. Rev.*, *No. 89*, 345-350: also *J. Med. Assn. Formosa No. 137*, 183-261.

TAKEGAMI, K. (1915): Some additional notes on the animal parasites. *Formosa Agr. Rev. No. 102*, 648-650.

TAKEGAMI, K., HATTORI, M., and TANABE, K. (1914): On the distribution of Schistosomidae in Formosa (1st report). *Formosan Agr. Rev. No 90*, 440-441.

TOMIMATSU, T., HAMAGUCHI, H., HASHIMOTO, N. and NAKAMURA, Y. (1952): On the condition of stray dogs infected with schistosomiasis japonica in Miyaki-gun, Saga-ken, Japan. *J. Kurume Med. Assn. 15* (1-2), 35-39.

TUBANGUI, M. A. and PASCO, A. M. (1941): Studies on the geographical distribution, incidence and control of schistosomiasis japonica in the Philippines. *Philippine J., Sc.*, *74*, 301-327.

WRIGHT, W. H., MCMULLEN, D. B., BENNETT, H. J., BAUMAN, P. M. and INGALLS, J. W. (1947): The epidemiology of schistosomiasis japonica in the Philippine Islands and Japan. III. Surveys of endemic areas of schistosomiasis Japonica in Japan. *Am. J. Trop. Med.*, *27*, 417-447.

WU, K. (1938): Cattle as reservoir hosts of schistosomiasis japonica in China. *Am. J. Hyg.*, *27*, 290-297.

WU, K. (1940): Schistosomiasis japonica among sheep and goats, with a review of the reservoir hosts from China. *Far East Assn. Trop. Med. Compt.-Rend.* 10 *Cong.* (*Hanoi, Nov. 26-Dec. 2, 1938*), 2, 721-725.

WU, K. and CHEN, C. Z. (1941): A preliminary report on the animal helminths from Shanghai abattoirs. *Peking Nat. Hist. Bull.*, *15*, 217-223.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

NEUES UEBER DIE DURCH *PNEUMOCYSTIS CARINII* VERURSACHTEN INTERSTITIELLEN PNEUMONIEN DER SÄUGLINGE.

OTTO JIROVEC (*)

Seit der ersten 16 Todesfällen bei 2-5 monatlichen Säuglingen, bei denen wir in den Lungenalveolen einen Massenbefall durch den Parasiten *Pneumocystis carinii* beschrieben haben (Vanek u. Jírovec 1951, 1952), gelang es uns in den letzten 2 Jahren bisjetzt bei fast 300 weiteren Todesfällen denselben Parasiten massenhaft vorzufinden. Die meisten Todesfälle kommen aus dem Kreis Olmötz (etwa 80) und Bratislava (etwa 70), die anderen waren über das ganze Gebiet von CSR zerstreut. Bei einer Mortalität von 10-60% dürften in der genannten Zeit im Ganzen etwa 1000-2000 Säuglinge an diese *Pneumocystis*-Pneumonie erkrankt sein. Weitere Bestätigungen kamen aus Deutschland, Ungarn, Oesterreich und der Schweiz, in letzter Zeit auch aus England. Die meisten Kinder starben im Alter von 2-5 Monaten, wir fanden aber *Pneumocystis* auch bei zwei 2-wöchentlichen Kindern und ferner auch bei älteren 6-8 monatlichen Kindern. (Tabelle 1). Ausserden fand Prof. Pavlica noch einen Todesfall bei einen 5-jährigen debillen Mädchen und 2 besondere Fälle beschrieb Vanek: bei einer 60-jährigen Frau, die an malignes Lymphogranulon gestorben ist, vor dem Tode aber eine mehrere Monate lang dauernde Pneumonie aufwies, die nicht auf sulphonamide oder Antibiotica reagierte, Fand er in der Lunge massenhaft *Pneumocystis* in typischer Form. Im zweiten Fall - bei einem 47-jährigen Mann, der an Leukoemie gestorben ist, fanden sich in der Lunge als Nebenbefund einzelne grosse Pneumocystis-Herde. Die Todesfälle scheinen über das ganze Jahr ziemlich unregelmässing verteilt zu sein (Tabelle 2.), was aber natürlich keineswegs ein Saisonauftreten der interstitiellen *Pneumonien* negiert, da die leichten Pneumocystis-Pneumonien der richtigen Diagnose entgehen. *Die Inkubationszeit* ist mindestens 8-10 Tage, wie aus einigen epidemiologischen Nachforschungen hervorgeht, meistens scheint sie aber 3-4 Wochen,

---

(*) *Protozoologisches Laboratorium der Akademie der Wissenschaften und Parasitologisches Institut der Karls-Universität in Praha.*

TABELLE 1 - *Statistik der Pneumocystose-Todesfälle*: 1951-1953: *Alter.*

Wochen	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21-25	26-30	31-40	Zusammen
Knaben . .	1	0	1	0	3	0	12	3	14	11	31	7	9	10	14	2	12	1	7	6	2	4	150
Mädchen . .	1	1	4	1	4	2	15	5	19	7	28	14	11	3	14	8	2	0	5	4	3	0	151
Zusammen .	2	1	5	1	7	2	27	8	33	18	59	21	20	13	28	10	14	1	12	10	5	4	301

TABELLE 2 - *Statistik der Pneumocystose- Todesfälle*: 1951-1953: *Monat des Todes*

Monat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Zusammen
Knaben . .	13	8	10	6	14	12	14	14	13	12	17	10	143
Mädchen .	17	8	8	9	16	5	19	13	16	15	14	12	152
Zusammen	30	16	18	15	30	17	33	27	29	27	31	22	295

TABELLE 3 - *Statistik der Pneumocystose-Todesfälle*: 1951-1953: *Geburtsgewicht.*

in Gram	1000-1500	1500-2000	2000-2500	2500-3000	3000-3500	3500-4000	über 4000	Zusammen
Knaben . . .	12	28	36	18	17	11	3	125
Mädchen. . .	15	34	28	27	12	12	2	130
Zusammen . .	27	62	64	45	29	23	5	255

vielleicht noch mehr betragen. Die *Krankheitsdauer* ist meistens 7-14 Tage, manche Fälle starben in noch kürzerer Zeit; manchmal scheint eine prolongierte Krankheitsdauer stattzufinden. Die typischen klinischen Zeichen sind allgemein bekannt (Tachypnoe, Dyspnoe, Zyanose usw.). 2/3 der Todesopfer waren Frühgeburten, 1/3 normale Geburten. 3/4 der Erkrankten waren dystrophische Kinder, die noch durch verschiedene Komplikationen abgeschwächt waren. Nachdem die Kinder ein Alter von 5-6 Monaten erreichen und ihr Ernährungszustand sich gebessert hat, scheint der Parasit seine Gefährlichkeit zu verlieren und nur für ganz abgeschwächte ältere Kinder oder auch Erwachsene kann er wieder gefährlich werden. Erfahrene Kliniker erkennen mit ziemlich grosser Gewissheit die *Pneumocystis*-Pneumonien auch an lebenden Kindern, doch eine Sicherheit kann bisjetzt nur der histoparasitologische Befund in den Lungen selbst bringen. Nach den Untersuchungen, von Dvoracek, Bárta und Kadlec (1953) einerseits und von Vivell (1954) in Freiburg anderseits scheint die *Komplementbindungsreaktion* mit einem aus *Pneumocystis*-Lungen bereiteten Antigen ziemlich erfolgreich zu sein. Der *Kutantest* zeigte sich in meinen Versuchen für Diagnose an erkrankten Säuglingen nicht geeignet, doch offenbar könnte er gute Dienste zum Erforschen der Durchseuchung gewisser Populationen leisten. Ich fand z.B. bei fast 10% von Arzten und Schwestern aus stark mit *Pneumocystis* befallenen Säuglingsstationen eine stark Reaktion während in anderen Populationen eine ähnlich starke Reaktion bei nur 1-4% zu verzeichnen war.

Die *Therapie* der *Pneumocystis*-Pneumonien ist bisjetzt gar nicht befriedigend. Eine exakte Bewertung der therapeutischen Versuche ist sehr schwer, da in den einzelnen Epidemien die Mortalität zwischen 10-60% schwankt. Sulphonamide und Antibiotica haben keine Wirkung. Auch mit Chloromycetin, dass von einigen empfohlen wurde, erzielten unsere Paediater keine Erfolge. Durch beide Mittel werden natürlich die Komplikationen praktisch beseitigt, doch der Verlauf der *Pneumocystis*-Erkankung bleibt derselbe. In einigen Fällen schienen die Antimalarica (Atebrin, Plasmochin, Stovarsol u.a.) geholfen zu heben, doch in anderen konnten auch sie den Todesverlauf der Krankheit nicht verhindern. Einige Forscher berichten über günstige Erfolge in Behandlung mit Cyren B, Nipagin, Kavitrat, Röntgenstrahlen, andere konnten aber auch mit diesen Mitteln keine eindeutigen Erfolge sehen, falls wirklich ein grösseres Material und Epidemien mit einer hohen Mortalität untersucht wurden. Sauerstoff und möglichst vollständige Ruhe scheinen z.Zeit die besten Mittel zu sein, die wir haben.

Ueber die *Epidemiologie* der *Pneumocystis*-Pneumonien lässt sich z.Z. nur folgendes sagen: die meisten Infektionen sind nosokomialer Herkunft. Nur ganz wenige Säuglinge haben sich zu Hause infiziert. Für das Entstehen des Krankheitsbildes ist eine Schädigung des Kindes, sei es durch Frühgeburt, sei es durch verschiedene Infektionen oder Ernährungsfehler u.a. nötig. Das gefährlichste

Alter ist 1-4 Monate, wir sahen Anstalten, wo sukcessiv alle Kinder in diesem Alter erkrankten, während ältere Kinder (5-8 Monate) verschont blieben. Als *Reservoir* der Infektionen dürften folgende in Betracht fallen:

1. Der *kranke Säugling* selbst, der die Parasiten (vielleicht ganze Parasitenklumpfen oder nur ihre Sporen) teils durch Ausatmen teils die verschluckten Sporen oder Parasitenklumpfen durch den Darm ausscheidet und auf diese Art in seine Umgebung massenhaft verbreitet.

2. Die Befunde von *Pneumocystis* bei *Erwachsenen* zeugen dafür, dass auch diese — als latente Träger — die Infektion verbreiten können. Dafür zeugen auch die Positivität des Hauttestes bei einer Anzahl von normalen Leuten, sowie die mikroskopischen Befunde von Pneumocystis in den Lungen von 15% wahllos untersuchten Leichen durch WEISSE und WEDLER (1954). Die Ausscheidung der Parasiten düfte auf gleiche Art geschehen, wie bei den Erkrankten Säuglingen; natürlich nicht so massig wie bei diesen.

3. Da bekanntlich *Pneumocystis* auch bei *Tieren* (Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Hunden u.a.) vorkommt, müssen wir auch diese als Resevoire der Infektion ansehen. Es scheint mir aber auf Grund eigener Untersuchungen die Infektion bei diesen ziemlich selten vorzukommen und sie dürften deshalb in Mitteleuropa keine grössere Rolle in der Epidemiologie spielen.

Als *Prevention* ist eine strenge Separierung der an *Pneumocystis*-Pneumonie erkrankten oder auch nur verdächtigen Säuglinge angebracht, unter strenger Befolgerung aller Desinfektionsmassnahmen, wie bei einer hoch ansteckenden Krankheit. Mit der von TOBLER empfohlenen Bestrahlung der Säuglingsräume mit UV-Licht haben wir bei uns noch keine Erfahrung. Gleichzeitig werden auch die nötigen Massnahmen gegen Insekten (Fliegen, Mücken, Schaben usw.) mit DDT und HCH eingeleitet. Auch die Ratten und Mäuse müssen in allen Krankenhäusern, Säuglingsstationen usw. energisch bekämpft werden. Prophylaktisches Verabreichen von Arsen-Präparaten, γ-Globulin oder von Cyren B ist noch nicht am grösseren Materiale eingewandtfrei erprobt worden.

In den meisten histoparasitologisch untersuchten interstitiellen Pneumonien wurde bisjetzt *Pneumocystis carinii* festgestellt, meistens in grossen Massen. Damit will ich aber keineswegs behaupten, dass es nur durch *Pneumocystis* verursachte interstitielle Pneumonien und keine andere Art gibt. (Nebenbei gesagt, ist aber bei den sg. Virus-Pneumonien keineswegs ihre Uebertragbarkeit durch ein bakterienfreies Filtrat exakt nachgewiesen worden). Von den Kochschen Postulaten zum Beweis eines Krankheitserregers ist bisjetzt nur das erste, d.h. regelmässiger Nachweis des betreffenden Parasiten bei den meisten interstitiellen Pneumonien erfüllt warden. Das zweite — die Uebertragung des Parasiten auf Versuchstiere ist bisjetzt niemandem gelungen (siehe auch die neue Arbeit von HERZBERG). Spontaninfektionen der Laboratoriumstiere mit *Pneumocystis* machen auch jeden exakten Beweis einer gelungenen Uebertragung sehr schwer. Das dritte Postulat — die Kultur des Erregers —

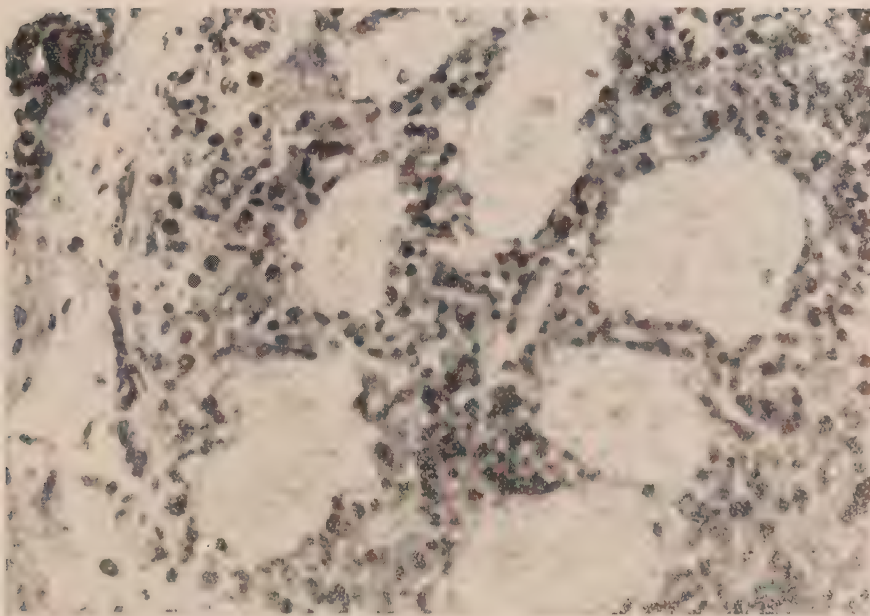


Abb. 1. - Schnitt durch eine mit *Pneumocystis carinii* reichlich infizierte. Lunge. Foto O. Jirovec. 200 x. Trichrom.

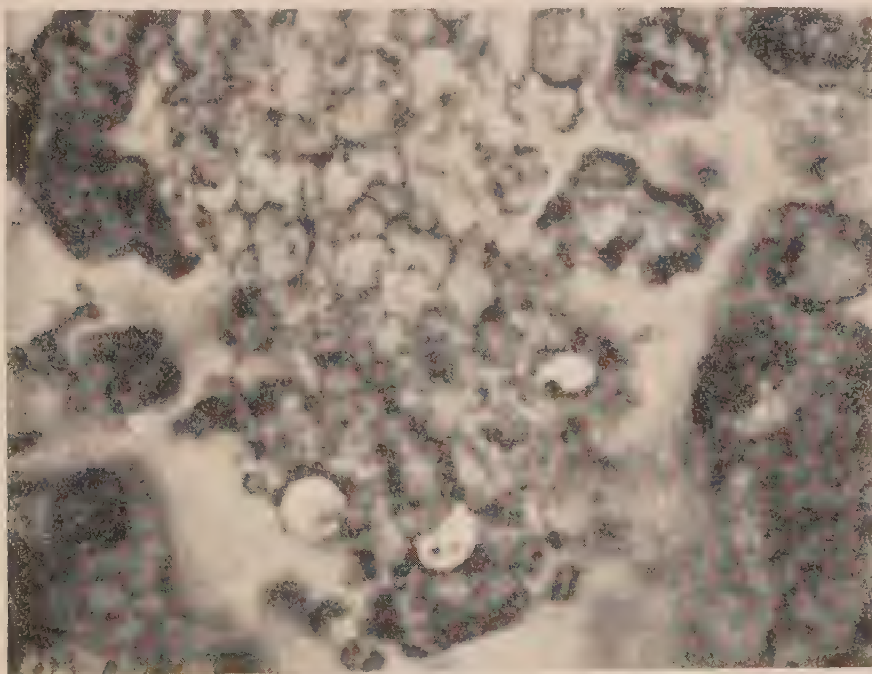


Abb. 2. - *Pneumocystis carinii* im Phasenmikroskop. Schnittpräparat. Gram-Weigert. Die Sporogonien leuchten infolge ungenügender Entwässerung durch das Anilinöl stark auf. Foto L. Cerva. 1500 x.

ist auch hier nicht erfüllt worden. Die von einigen Autoren erzielten Kultivationen von Hefen aus Lungen verstorbener Pneumocystosen sind meiner Ansicht nach nur ein Beweis, dass bei dystrophischen Säugligen die Hefen und hefeartigen Organismen aus oberen Luftwegen auch tief in das Lungenwebe eindringen können und dann herausgezüchtet werden. Ausserdem sind nicht in jedem Falle solche Hefen aus den Pneumocystis-Lungen herauszuzüchten. Wir sehen aber, wie in den von Parasiten ganz ausgefüllten Lungenalveolen unter gleichzeitiger Infiltration des Interstitiums grosse Bezirke der Lungen aus ihrer Funktion herausfallen, so dass zuletzt das Kind erstickt. Ob auch irgendwelche Toxinwirkung anwesend ist, ist noch nicht bewiesen, aber möglich. Jedenfalls ist die primäre Pathogenität von *Pneumocystis carinii* nicht gross und sie entfaltet sich offenbar nur in einem anderswie beschädigten Wirtsorganismus. Dass aber das Tod-Ersticken unter Versagen des Kreislaufes, durch das massive Entwickeln der Pneumocystis verursacht wird, scheint uns durch unsere histopathologische Befunde eindeutig bewiesen.

Was die *systematische Stellung* von *Pneumocystis* anbetrifft, haben wir sie provisorisch zu den *Haplosporidien* gestellt. Eine Umgruppierung ist erst dann angebracht, wenn dafür exakte Beweise vorliegen. Diese Beweise scheinen mir aber weder von GIESE noch von CSILLAG, BAUCH-LADSTÄTTER, SIMON u. a., welche Pneumocystis für Hefen oder für Candida-Arten betrachten, gebracht worden. Die Gram-Positivität der Sporogonien von *Pneumocystis* ist nämlich eine nur vorübergehende — in der Aussenmembran erscheinen vorübergehend Gram-positive, stark wasserhaltige und deshalb im Phasenmikroskop stark lichtbrechende Substanzen, die aber in ausgereiften Sporogonien wieder Gram-negativ geworden sind. Das histopathologische Bilde, welches CSILLAG u. BRANDSTEIN mit ihren Hefe-Kulturen in der Lunge künstlich mit massiven Dosen intranasal infizierten Mäusen unter Penicillinzusatz erhielten, ist principiell ganz anders, als bei den Kindern: die Lungenalveolen sind mit Histiocyten und anderen Wirtszellen ausgefüllt, welche zahlreiche typische Hefezellen phagozytiert haben. Die für *Pneumocystis* typische Schaummassen fehlen gänzlich. Die Kulturversuche an Hefenährböden halte ich nicht für überzeugend, da in oberen Luftwegen recht viele verschiedene Hefe — und Candida-Arten anwesend sind und ausserdem die Zellstrukturen in solchen Kulturen nur eine oberflächliche Ähnlichkeit mit *Pneumocystis* aufzeigen. Aus diesen Gründen ist eine Nachprüfung der Hefetheorie am grossen Material durch morphologisch gut geschulte Mikrobiologen erforderlich.

Die Erforschung der Pneumocystis-Pneumonien ist ein schönes Beispiel komplexer Zusammenarbeit von Pathologen, Parasitologen und Paediatern. Es ist zu erhoffen, dass diese Zusammenarbeit in der Zukunft auch noch zu einer erfolgreichen Therapie und Prophylaxis dieser tückischen und verheerenden Säuglingskrankheit führen wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Die interstitielle plasmozelulläre Pneumonie der Säuglinge, welche durch den Parasiten *Pneumocystis carinii* verursacht wird, ist zu einem sehr ernsten Problem der Frühgeburtenanstalten in ganz Europa geworden. Nur in der Tschekoslowakei erlagen in den letzten 3 Jahren über 300 Säuglinge, meistens im Alter von 2 - 4 Monaten. Die Infektion geschieht offenbar aerogen, die Parasiten erfüllen in grossen Massen die Alveolen und dies verursacht das Ersticken des Kindes. Der erste erkrankte Säugling ist die gefährlichste Quelle weiterer Infektionen anderer Säuglinge in dem gefährlichen Alter von 1 - 4 Monaten. Offenbar können auch latent infizierte Erwachsene die Infektion gelegentlich auf Säuglinge in diesem Alter übertragen. Die Mortalität der Säuglinge wechselt zwischen 10-60%. Eine verlässliche Therapie ist noch nicht erfunden worden. Die Infektion durch *Pneumocystis* wurde auch in den Lungen einiger durch andere Erkrankung abgeschwächten Erwachsenen gefunden.

RIASSUNTO

La polmonite interstiziale plasmacellulare dei lattanti da *Pneumocystis carinii* è divenuta uno dei problemi medici più gravi in tutta l'Europa. Le statistiche per la Cecoslovacchia danno più di 300 casi letali durante questi ultimi 3 anni, la maggioranza dei quali in bambini dell'età di 2 - 4 mesi. L'infezione si contrae apparentemente per via respiratoria; i parassiti in grandi masse riempono gli alveoli determinando il soffocamento del bambino. Il primo bambino infetto diviene sorgente pericolosissima di infezione per gli altri bambini di 1 - 4 mesi, specialmente nei reparti pediatrici. Secondo la nostra esperienza, adulti con infezioni latenti possono occasionalmente trasmettere l'infezione a bambini appartenenti all'età recettiva. Il tasso di mortalità oscilla tra il 10 ed il 60%. Mezzi terapeutici efficaci non sono ancora conosciuti. L'infezione da *Pneumocystis* è stata riscontrata anche nei polmoni di adulti debilitati da altre malattie.

SUMMARY

The interstitial plasmacellular pneumonia of infants caused by the parasite *Pneumocystis carinii* has become one of the most serious medical problems in the whole Europe. The statistics for Czechoslowakia give more than 300 mortal cases during the last 3 years, the majority of them in the age of 2 - 4 months. The infection spreads apparently by aerogen route; the parasites in great masses fill the alveoles and this causes the suffocation of the child. The first infected child becomes a most dangerous source of further infections by other infants aged between 1 - 4th month, especially in Children Wards. In our experience latent infected adults, may ocasionally carry over the infection to infants belonging to the infective age. The mortality rate is stated to be between 10 - 60%. An effective therapeutic measure has not yet been found. The pneumocystis infection was found also in the lungs of some adults whose organism was weakened by some other illness.

BIBLIOGRAPHIA

BACHMANN KL. DITMAR (1953): Uber die Anwesenheit von Pneumocystis carinii bei den frühkindlichen plasmazellulären interstitiellen Pneumonien. *Ztschr. f. Kinderheilk.*, *73*, 632.

BAUCH R., LADSTÄTTER L. (1953): Pneumocystis carinii und interstitielle plasmazellulare Pneumonie der Fruhgeburten. *Klin. Wschr.*, *31*, *37/38*, 900-902.

BRUNS G. (1954): Zur Morphologie der Pneumocystis carinii. *Zentrbl. f. allg. Pathol.*, *91*, 168-173.

CSILLAG A., BRANDSTEIN L., FABER V., MACZO J. (1953): Adatok a koraszülöttkori interstitialis pneumonia koroktanàhoz. - Beiträge zur Aetiologie der interstitiellen Pneumonie der Frühgeburten. *Orvosi hetilap, 47*, 1303-1304.

DEAMER W. C., ZOLLINGER H. W. (1953): Interstitial plasma cell pneumonia of prematuree and young infants. *Pediatrics, 12*, 11-22.

DIETEL V. (1953): Behandlungsversuch der interstitiellen Pneumonie mit Rekonvaleszentblut. *Monatschr. f. Kinderheilk., 101*, 438-439.

DITTRICH J. K., SEIFERT G. (1953): Zur Frage der Beziehungen zwischen Cytomegalie, interstitieller Pneumonie und Erythroblastose. *Ztschr. f. Kinderheilk, 73*, 639.

FASSKE E., KÖNIG H., PLETTENBERG W., SAUERBEI H. U. (1954): Beobachtungen bei interstitieller Pneumonie im Säuglingsalter. *Zentrbl. allg. Pathol. 91*, 267-279.

GIESE W. (1953): Die Aetiologie der interstitiellen plasmazelllulären Säuglingspneumonie. *Montaschr. f. Kinderheilk., 101*, 147-149.

GIESE W. (1952): Pathogenese und Aetiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Freiburger Tagung d. deutsch. Gesellsch. f. Pathologie, 284-289.

GIESENBAUER W. (1941): Uber die sogenannte interstitielle Pneumonie frühgeborener und schwächlicher Kinder. *Monatschr. f. Kinderheilk., 86*, 111.

HAMPERL H. (1952): Zur Frage des Parasitennachweises bei der interstiziellen plasmazellulären Pneumonie. *Klin. Wschr. 30*, 820-822.

HERZBERG K., HERZBERG H., KREMMER, MAY G. (1954): Weitere Untersuchungen über Pneumocystis carinii bei Säuglingspneumonien. *Zentrbl. Bakter., 160*, 660-670.

KORPASZY B., TIBOLDI T., TOROK J., WALTNER K., DIOSSZILAGYI G., PALDY L., TOROK J., KOLTAY M. (1954): Die interstitielle Pneumonie del Frühgeborenen. *Acta med. Acad. Sc. Hung., V*, 3-4.

KOSENOW W. (1954): Die interstitielle Pneumonie, eine altersgebundene Infektionskrankheit frühgeborener u. dystrophischer Säuglinge. *Deutsche med. Wschr., 79*, 75.

LEIBER B. (1952): Die Hormonbehandlung der interstitiellen (plasmazellulären) Pneunie der frühgeborenen Kinder. *Monatschr. f. Kinderheilk., 100*, 4, 1187.

LORENZ K. (1953): Uber die Behandlung der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie mit Chloramphenicol. *Kinderärzt. Praxis, 21*, 193-200.

MEER VAN DER G., BRUG S. L. (1942): Infection à Pneumocystis chez l'homme et chez les animaux. *Ann. soc. belge méd. trop., 22*, 4.

MORITSCH H. (1953: Ein Beitrag zur Aufklärung der Aetiologie der akuten interstitiellen plasmazellulären Pneumonie. *Wiener kl. Wschr., 15*, 289.

PETERSEN U. K. (1953): Beobachtùngen fur Entstehùng ùnd Behandlùng der interstitiellen Säuglingspneumonie. *Münchener Med. Wschr., 95*, 1252-1254.

PLIESS G. (1953): Die Pneumocystis carinii und ihre Bedeutung bei der interstitiellen plasmazellulären Säugliengspneumonie. *Frankf. Zeitschr. f. Path., 64*, 185-208.

ROPKE G. (1953): Uber die Serumeiweissverhältnisse bei frühgeborenen Kindern unter besonderer Berücksichtigung der plasmazellulären Pneumonie. *Zeitschr. f. Kinderheilk., 73*, 601.

SCHLANGE H. (1953): Beitrag zur Klinik der frühkindlichen interstitiellen Pneumonie. *Kinderärzt. Praxis, 21*, 145.

SEIFERT G. (1954): Weitere Untersuchungen zur Frage der Syntropie von interstitieller Pneumonie u. Zytomegalie. *Zenthbli. allg. Pathol. 91*, 445-450.

SIMON H. (1953): Die sogenannte Pneumocystis carinii, eine besondere Vegetationsform des Soor. *Naturwiss., 40*, 625-626.

STOPKA E. (1952): Vorkommen u. Häufigkeit von Pneumocystis carinii bei interstitieller Pneumonie. *Kinderärzt. Praxis, 20*, 12, 529-533.

TOBLER W. (1953): La pneumonie interstitielle des prématurés. *Arch. franc. de pédiatr., X*, 337.

WEISSE K., WEDLER E. (1954): Ueber das Vorkommen der sg. Pneumocystis carinii. *Klin. Wschr., 32*, 270.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

CYSTOFILARIA BALKANICA SKRJABIN Y SCHRIKHOBALOVA 1948 = *FILARIA* SP. SIMITCH, KOSTITCH Y MLINAC 1938 = *SPIROCERCA LUPI* (RUDOLPHI 1809) CHITWOOD 1932.

CARLOS R. LOPEZ-NEYRA (*) y DIEGO GUEVARA POZO (**)

Una imperfecta descripción de los nematodes alojados en nódulos formados bajo la túnica muscular del esófago del perro en Skoplje, Servia del Sur, (dados a conocer por SIMITCH, KOSTITCH y MLINAC en 1938, como *Filaria sp.*), y una peor interpretación de la misma, dieron lugar a que estos parásitos fueran llamados por SKRJABIN y SCHRIKHOBALOVA en 1948 *Cystofilaria balkanica n.gen n.sp.*, lo cual indujo a error a CHABAUD y CHOQUET en 1953 al admitirlos como género válido en *Filaroidea* dentro de la subfamilia revalorizada *Onchocercinae*, y situarlo en sus claves muy próxima al *Cordophilus* Mönning 1926, del que se distingue por tener la extremidad posterior del cuerpo normal y no muy adelgazada, las papilas cloacales gruesas y pedunculadas (no sentadas como en *Cordophilus*), ser ovíparos, con ovoyector provisto de un receptáculo sacciforme y ser parásitos esofágicos de carnívoros.

Su desarrollo en el interior de tubérculos reaccionales fibrosos, submusculares esófagicos, hasta el tamaño de un huevo de paloma, que encierran de 4 a 30 vermes en los que predominan las hembras, nos hizo pensar en la cosmopolita *Spirocerca lupi* (Rudolphi 1908) Chitwood 1932 (= *Spirocerca sanguinolenta* (Rudolphi 1819) bien conocida de uno de nosotros desde 1916 (LOPEZ-NEYRA) que la halló por primera vez en Granada y luego en todas las regiones de España, donde hemos disecado cánidos. En efecto, toda la morfología y anatomía general de los supuestos *Cystofilaria balkanica*, así como las dimensiones totales y de los diferentes órganos, los datos cefálicos y caudales distintivos, huevos, etc., están encuadrados en los límites de variacíon del *Spirocerca lupi* Así mismo aparecen en distintas descripciones y figuras de ambas especies los cuatro pares de papilas preanales, grandes, pedunculadas, y los dos pares

(*) Director del *Instituto Nacional de Parasitología, Granada.*
(**) Jefe de Sección del *Instituto Nacional de Parasitología, Granada.*

semejantes postanales, mientras pasa desapercibida para muchos observadores, tambien en una y otra especie, la formación papiliforme impar precloacal y los (hasta cinco) pares de papilas muy pequeñas, existentes cerca de la punta caudal de los machos, en su cara ventral.

Simitch y colaboradores dicen que el macho posee una sola espícula de 2,5 á 2,9 mm. de longitud, y que existe una pieza accessoria en forma de cuerno de 620-150 micras de longitud (creemos que la segunda cifra, es errata de 750) órgano que no es gubernáculo, sino le espícula derecha o menor de la *S. lupi*, con la que coincide en magnitud y forma, así como tambien coincide la espícula mayor o izquierda, mientras el diminuto gubernáculo, transparente y en herradura, es muy fácil que pase inadvertido, como parece haber ocurrido a los autores servios.

Por otra parte; se considera un dato anatómico muy distintivo de *C. balkanica* — y por ello utilizado como tal por Chabaud y Choquet en 1953 — el que las hembras, partiendo de la vulva que está situada a 2,5-2,9 mm. del extremo cefálico, (los límites de variabilidad en la *Sp. lupi* son aún mas amplios, pues van desde el nivel de la segunda mitad del esófago glandular hasta posterior e él) (1), presentan un canal que a corta distancia forma un grueso divertículo, bifurcandose a continuación en dos ramas que son los tubos uterinos. (fig. 4, A, p. 26 de Simitch y col.).

Este órgano y su desarrollo evolutivo, está perfectamente descrito y figurado por Seurat en su tratado de « Nematodes de la Berbería » (Alger, 1920, pp. 81-83, fig. XVI, 5) en la *Spirocerca lupi,* diciendo: « La structure definitive de l'ovéjecteur est acquise à la suite d'une double courbure en S du sphinter, dont la region proximale vient s'accoler à la région dorsale subterminale du vestibule (fig. XVI, 5) », figura que a menor aumento y deficiente interpretación corresponde a la figura 3, A y fig. 4 A de Simitch y colaboradores. Se detalla análogamente esta organización al describirse la *Cylicospirura subaequalis* (Molin 1860) Vevers 1912, y la *C. felineus* Chandler 1925, de las que Baylis dice: « the vagina as runnings forward at first from vulva at a distance of about 1 mm. from which it is enlarged to form a *saclike bulb*. It then continues forward for a short distance as a thinwalled tube, and turns to run backward for about 2,5 mm. before giving off two uterine branches ».

Los datos numéricos dimensionales de ambas aparentes formas, cuya identificación proponemos, pueden verse en el adjunto cuadro, obtenido de las diversas descripciones, y donde resulta que *Cystofilaria balkanica* de Skrj. y Schikh. 1948 = *Filaria* sp. de Simitch y colab. 1938, es un sinónimo de *Spirocerca lupi* (Rudolphi 1809) Chitwood 1932.

(*) Nuestra observación personal de 1916 es confirmada por Seurat (1918 p. 1101) al analizar variaciones de nematodes, de preferencia espiruridos.

Nombre utilizado . . .	*Spirocerca lupi* (Rud. 1809) Chitwood 1932 = Sp. *sanguinolenta* (Rud.)				*Cystofilaria balkanica* Skrj. y Schrikh. 1948 = *Filaria sp.* Simitch y colaboradores 1938
autor y año	de los autores en Neveu - Lemaire 1936	Baylis 1939	Goyanes 1937	Personal	
Macho					
Longitud total	30 - 54	30 - 54	36 - 46	35 - 51	45 - 50
Latitud máxima . . .	0,76	hasta 1 mm	0,504 - 0,88	0,55 - 0,91	0,7 - 0,9
Long. del esófago . . .	5,8	5,8	4,8 - 6,48	5 - 6,9	5,5 - 7
Long. esóf. muscular .	—	0,65 - 0,75	—	0,6 - 0,75	—
Espícula izda	2,45	2,45	2,75 - 3,01	2,4 - 3	2,5 - 2,9
Espícula dcha	0,75	0,48 - 0,75	0,58 - 0,74	0,6 - 0,75	0,62 - 0,15 (errat. 0,75)
Gubernáculo	—	en herradura	en escudete	en herradura	no visto
Papilas preanales pares	4	4	4	4	4
Papilas postanales . .	2	2	2	2	2
Papila impar preanal. .	—	presente	presente	presente	—
Papilas punta caudal. .	—	5	varias	hasta 5 - pares	—
Alas laterales caudales .	presentes	presentes	presentes	presentes	presentes pequeñas
Hembra					
Longitud total	54 - 80	54 - 80	48 - 62	55 - 75	50 - 65
Latitud máxima . . .	1,15	hasta 1,5	0,72 - 0,916	0,75 - 1	0,9 - 1,2
Longitud esófago . . .	7	7	4,8 - 6,72	5,0 - 7,2	5,5, - 7
Vulva: extr. cefálica .	2 - 4 (variabile)	posterior al extr. esófág.	Unión esóf. con intest.	2,6 - 4,1 (var.)	2,5 - 2,9
Ano: punta caudal . .	0,4 - 0,45	0,4 - 0,45	0,24 - 0,36	0,4 - 0,45	—
Huevos (en micras) . .	30 - 37,5 x 11 - 15	30 - 38 x 11 - 15	30 - 36 x 15	30 - 36 x 15	—

RESUMEN

Se propone la identitad de las especies consignadas en el título del presente trabajo deducida de observaciones personales así como de figuras, descripciones y medidas de otros autores.

RIASSUNTO

In base ad osservazioni personali ed alle figure, misure e descrizioni date da altri Autori viene dimostrata l'identità delle specie ricordate nel titolo.

SUMMARY

The identity of the species mentioned in the title is demonstrated by figures, measurements and descriptions from several workers as well as from the authors' observations.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SUL MODO DI SVERNARE DELL'ANOPHELES LABRANCHIAE IN SICILIA IN CONDIZIONI DI VITA EXTRA-DOMESTICA. (*)

M. MARIANI (**) e M. CEFALU' (**)

In prosecuzione delle ricerche eseguite sulla vita dell'*A.* (*Maculipennia*) *labranchiae* in Sicilia (CEFALÙ, 1954), abbiamo cercato di approfondire le nostre conoscenze sulla maniera di trascorrere l'inverno da parte di questa specie in condizioni di extra-domesticità.

Mentre altre specie di *Anopheles* svernano allo stato di uovo o di larva, l'*A. labranchiae* passa l'inverno allo stato immaginale. G. B. GRASSI (1927) nelle Sue « Lezioni sulla Malaria » dice infatti:

« ...*claviger* (1) e *superpictus* ibernano soltanto come insetto alato (femmina) ».

Tutte le specie appartenenti al sottogenere *Maculipennia* Buon. e Mar. svernano allo stato di adulto, ma non tutte si comportano ugualmente nei confronti delle diapause invernali.

Le cognizioni comuni sull'ibernamento e su altri atteggiamenti biologici dell'*A. labranchiae* furono per un certo tempo imprecise, soprattutto perchè in parte dedotte da osservazioni riferibili a varie specie e particolarmente all'*A. maculipennis*.

Sono note, per ciò che si riferisce al fenomeno dell'ibernamento, le classiche osservazioni di SWELLENGREBEL (1929) sull'*atroparvus*, razza nordica dell'*A. labranchiae*. In *atroparvus* egli osservò, infatti, una diapausa ovarica non coincidente con la diapausa trofica che chiamò « dissociazione gonotrofica »; HACKETT e MISSIROLI (1935) notarono che il *labranchiae* ha un breve periodo di

---

(*) Le presenti ricerche fanno parte di un programma di studi eseguiti sotto gli auspici e con il contributo dell'Alto Commissariato per l'Igiene e la Sanità.

(**) *Istituto d'Igiene e Microbiologia dell'Università di Palermo* (Direttore: G. D'ALESSANDRO).

(1) Qui GRASSI si riferisce a *maculipennis* riportandolo sotto il sinonimo *claviger* Fabricius (*nec Meigen*), nome sotto il quale l'intero gruppo di specie era comunemente conosciuto in quel tempo.

parziale sospensione di attività; LA FACE (1933) osservò che, a differenza di *maculipennis* e di *messeae,* l'attività ovarica di *labranchiae* può essere stimolata dalla temperatura (oltre 16° C.) e in tali condizioni è possibile ottenere, senza difficoltà, ovodeposizioni; BUONOMINI e MARIANI (1946) descrissero l'*A. labranchiae*: « Ibernante con sospensione dell'attività trofica ed ovarica delle femmine, attività che possono essere riprese con l'elevarsi della temperatura »; MILLETARÌ (1948) osservò che in Sicilia l'*A. labranchiae* continua a nutrirsi di sangue durante l'inverno; AITKEN (1953) rilevò che in Sardegna, durante l'inverno, l'*A. labranchiae* è in condizioni di semiattività, essendo molti individui capaci di prendere pasti di sangue.

* * *

Ci è servita, per le osservazioni, principalmente la zona del torrente Forgitella (Partinico, Prov. di Palermo) già descritta minutamente da uno di noi (CEFALÙ, 1954). In questa località, circostante un ricco focolaio larvale puro di *A. labranchiae,* venne eseguita una accurata e minuziosa esplorazione che mise in evidenza alcuni chiari aspetti della capacità di vita extra-domestica di questa specie: infatti, mentre nelle abitazioni e manufatti umani vennero rinvenuti rari adulti della specie, questi avevano domicilio in crepe di roccia ed in anfrattuosità del terreno (ricoveri capillari) non esposte ad inondazione per la pioggia, anche a notevole distanza dal focolaio larvale.

Fino al mese di novembre i focolai larvali, intensamente popolati da *A. labranchiae,* furono positivi; da questa epoca e fino a tutta la prima metà di aprile furono pescate nella zona solo alcune larve di *A. claviger.*

Durante il mese di gennaio 1954 la temperatura non discese al di sotto di 6°C. e non superò i 12°C. (all'ombra). In tali condizioni di temperatura, in ricoveri costituiti da piccole crepe di rocce furono catturate 23 femmine di *A. labranchiae* delle quali sette con sangue non digerito nel mesointestino. In febbraio, in altra contrada presa in osservazione (Forgia, Partinico), in un cunicolo da conigli vennero catturate 6 femmine di *A. labranchiae* e sulla volta di un sottopassaggio stradale 2 femmine della stessa specie di cui una con sangue; inoltre, a Pachino (Ragusa) 2 femmine di *A. labranchiae* di cui una con sangue in una grotticella con pipistrelli in letargo; in contrada Cappuccini, presso S. Leonardo (Ragusa), una femmina di *A. labranchiae,* anche questa in cunicolo da conigli, che ovodepose lo stesso giorno della sua cattura un gruppo di uova dall'aspetto simile a quello delle uova della razza *atroparvus* V. Th. (fondo bruno anzichè grigio azzurro brillante). Questo reperto coincide con le osservazioni di BUONOMINI e MARIANI (1946) sulla variabilità delle uova di *labranchiae.*

Da venti femmine raccolte nei mesi di gennaio e febbraio fu possibile estrarre il sangue dal mesointestino, senza danneggiare le ovaie, e le reazioni precipitanti diedero il seguente risultato:

Sangue appartenente a	N. dei campioni
Uomo	2
Bue	8
Cavallo	2
Pecora	1
specie non identificate	7

Dei 20 Anofeli, 2 avevano punto l'uomo, 11 avevano punto animali domestici e 7 animali non domestici e non identificati.

L'esame degli ovidutti, secondo il metodo di MER (1932), e la formula ovarica, secondo CHRISTOPHERS (1911) e NICHOLSON (1921), vennero eseguiti su 34 femmine, delle quali una soltanto presentava corpi adiposi; dall'esame dell'ovidutto di questa femmina si constatò che non aveva mai ovodeposto e l'ovario era al primo stadio di sviluppo. Nelle altre 33 femmine, multipare, l'ovario era in vari stadi di sviluppo, avvicinandosi nelle proporzioni alla formula ovarica teorica delle popolazioni di Anofeli. Come si è accennato, una delle femmine con ovario al 5° stadio di sviluppo, ovodepose subito dopo la sua cattura e dalle uova si ebbero larve, il che dimostra che la femmina si era accoppiata.

La proporzione fra multipare e nullipare, accertata attraverso la misurazione delle espansioni estreme degli ovarioli, diede una lieve maggioranza di nullipare.

In uno dei ricoveri naturali da noi individuato, gli Anofeli non vennero disturbati per tre mesi e, da gennaio a marzo, venne seguito l'andamento della popolazione. In tale ricovero si osservò la fluttuazione degli abitanti che alla prima osservazione erano soltanto tre ed oscillarono fra i tre ed i cinque nelle varie ore e nei vari giorni, venendosi con ciò a dimostrare che la loro attività non era interrotta dai rigori invernali.

Tuttavia sembrerebbe doversi concludere che, a differenza dell'*A. maculipennis* che va incontro ad un vero e proprio fenomeno di ibernamento, l'*A. labranchiae* presenta, soltanto eccezionalmente, una diapausa invernale strettamente legata alla temperatura. Le temperature inferiori ai 15°C. rallentano, cioè, il ritmo di sviluppo delle ovaie senza del tutto inibirlo, mentre la residua attività generale dell'insetto non ci permette di considerarlo in diapausa.

L'osservazione sopra riferita di una femmina che non aveva ovodeposto e con presenza di corpi adiposi induce a supporre che nelle femmine vergini schiuse a fine autunno, ed in quelle che comunque devono compiere un accoppiamento per dare uova feconde, possa verificarsi una vera e propria diapausa ovarica con formazione di corpi adiposi.

Una osservazione, che in parte coincide con le nostre, venne fatta da SAUTET (1934) in Corsica. Egli dice, riferendosi all'*A. labranchiae*: «i ricoveri invernali sono costituiti in Corsica principalmente da luoghi oscuri e disabitati... possiamo dire che le femmine ibernanti cercano particolarmente luoghi inabitati per compiervi la loro fase di riposo». Al riguardo noi pensiamo che il rifugiarsi delle femmine in ricoveri oscuri e disabitati non sia in rapporto alla ricerca di ambiente adatto per la ibernazione ma soprattutto espressione della extra-domesticità del *labranchiae* in alcune zone. Non si esclude che in condizioni climatiche avverse questi anofeli sospendano nei ricoveri in questione la loro attività.

I fatti lumeggiati nella presente nota ci sembrano di qualche interesse per spiegare la sopravvivenza della specie in condizioni di vita senza rapporto con i ricoveri costruiti dall'uomo.

RIASSUNTO

Attraverso la sistematica osservazione di una zona abitata dall'*A. labranchiae* viene ribadito il concetto che questa specie non è sottoposta ad una vera e propria diapausa invernale. Nel suo *habitat* extra - domestico e fuori da influenza umana, la specie rallenta, con i rigori invernali, la sua attività senza però sospenderla.

Infatti in Sicilia ricoveri capillari, costituiti da piccole anfrattuosità e crepe di rocce, risultarono abitati nei mesi di gennaio e febbraio da femmine di *A. labranchiae* nutrite di sangue e con ovari in vari stadi di sviluppo, fino al 5° stadio (ovaie mature).

SUMMARY

Through the systematic study of an *A. labranchiae* area, the authors confirm that this species, in its wild habitat and far from human influence, slows down its activity at the onset of winter.

In Sicily, in fact, narrow shelters (small slids and holes in the rocks) were found inhabited, during the months of January and February, by adult females of *A. labranchiae* which showed blood in their gut and ovaries at various stages of development, i. e. up to the fifth stage (mature ovaries).

BIBLIOGRAFIA

AITKEN T. H. G. (1953) in LOGAN J. A., The Sardinian Project, Johns Hopkins, Baltimore.

BUONOMINI G. e MARIANI M. (1946) in: Nuove vedute sulla malaria di M. ASCOLI. Ist. bibliogr. Ital., Roma p. 143 - 183.

CEFALÙ M. (1954): *Riv. di Malariol. XXXII*, 3-9.

GRASSI G. B. (1927): Lezioni sulla Malaria - *Nuovi Annali di Agricoltura, VII*: 153 - 280.

LA FACE L. (1953): *Riv. di Malariol., XII*, 1069.

MARIANI M. (1948): *Giorn. di Sc. Nat. ed Econ. di Palermo, 45*, Sez. II, 1-15.

MER G. (1932): *Bull. of Ent. Res., XIII*, 4.

MILLETARI A. (1948): *Atti I Congr. Internaz. Patol. Medit.*, 27-29 maggio 1948, 351.

SAUTET J. (1934): *Ann. Paras. Hum. et Comp., XII*, 8-14.

SWELLENGREBEL N. A. (1929): *Ann. Instit. Pasteur, XLIII*, 1370.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

STUDI SUI DITTERI LARVEVORIDI

II) *MEIGENIA MUTABILIS* FALL. SU *AGELASTICA ALNI* L. (COLEOPTERA CHRYSOMELIDAE)

EGIDIO MELLINI (*)

Introduzione

Qualche anno fa Kanervo e Talvitie (1946) pubblicarono in Finlandia un grosso lavoro dedicato alla *Meigenia mutabilis* Fall., sintetizzando quanto era già noto ed approfondendo varî aspetti della biologia di questo comunissimo larvevoride.

Lo studio comparato su circa una decina di specie di vittime, tutte larve di Coleotteri Crisomelidi, eccezion fatta per una, l'*Athalia colibri* Christ., ha portato gli AA. a conclusioni interessanti anche in relazione alla sistematica tanto controversa di questo dittero. Così essi, fra l'altro, hanno dimostrato che la durata dello sviluppo della *Meigenia*, le sue dimensioni, nonchè la longevità degli adulti e la fecondità delle femmine variano secondo le dimensioni delle specie ospiti. Alla notevole variabilità morfologica si è visto in tal modo corrispondere una grande duttilità di comportamento e di plasticità biologica.

Nonostante l'esistenza del dettagliato studio dei due entomologi finlandesi ho creduto opportuno condurre (approfittando di una fortissima invasione di *Agelastica alni* L. sugli Ontani, verificatasi nel 1953 in quel di Borgo Capanne, Porretta Terme, dove il dittero è molto comune) ulteriori ricerche sulla *Meigenia mutabilis* Fall., per illustrare nuovi aspetti della sua biologia ed in particolare le modalità di ovideposizione, la localizzazione delle uova sul corpo della vittima, il comportamento della larva parassita nell'emocele dell'ospite, la distribuzione degli imbuti respiratori, lo sviluppo del simbionte antagonista rispetto a quello dell'altro, ecc. Tutti dati che d'altronde mi sono necessari in relazione al programma di studio che intendo svolgere sui Ditteri Larvevoridi.

(*) *Istituto di Entomologia dell'Università di Bologna* (Direttore: Prof. G. Grandi).

Ho voluto altresì illustrare la morfologia degli stadi preimmaginali del nostro dittero, così comune su tante vittime (1) e così importante nel limitare le falangi di molti fitofagi nocivi (2), per rendere possibile la sua immediata identificazione e nel contempo per portare un nuovo contributo alla conoscenza, alquanto scarna, degli stadi preimmaginali della tribù *Blondeliini*. Le brevissime descrizioni di NIELSEN (1911), per quanto corredate dai disegni degli scheletri cefalo-faringei delle tre età e degli spiracoli anteriori e posteriori della larva matura, nonchè la raffigurazione dell'armatura bucco-faringeale della III[a] età data da VIMMER (1934), apparivano del tutto inadeguate alle moderne esigenze della ricerca.

La questione sistematica relativa al gen. *Meigenia* R. D. è nota. STEIN (1924) riconosce l'esistenza di una sola specie, la *M. mutabilis* Fall. BARANOFF (1928) nella grande varietà di forme comprese in questa entità specifica distingue negli esemplari serbi, in base ai caratteri dei genitali esterni maschili, 4 sottospecie. WAINWRIGHT (1932) va oltre e separa, sulla stessa base, le forme inglesi di *Meigenia* R. D. in 3 specie distinte. Ora l'esame dei caratteri dell'ipopigio nei miei esemplari da un lato, e i risultati degli studi di KANERVO e TALVITIE da un altro, mi hanno indotto a riferire gli individui da me ottenuti negli allevamenti di *Agelastica alni* L. alla *M. mutabilis* Fall. sensu STEIN. Infatti i paralobi dei genitali esterni maschili delle mie *Meigenia* presentano (pure con una certa variabilità) caratteri intermedi tra quelli della *M. mutabilis pilosa* Baranoff, ai quali si avvicinano per la discreta pelosità, e quelli della *M. bisignata* Mg. (= *M. mutabilis vulgaris* Baranoff), coi quali hanno in comune la curvatura verso il basso e la presenza delle brevi setole spiniformi verso l'estremità distale. E d'altronde il mesolobo ha di solito caratteri intermedi tra quelli della *M. mutabilis nobilis* Baranoff (per la leggera curvatura in basso) e quelli della *M. mutabilis pilosa* Baranoff (per la sensibile pelosità). D'altra parte i reperti dei due finlandesi più volte

---

(1) KANERVO e TALVITIE (1946) riportano un elenco di 26 specie, in grande maggioranza Coleotteri Crisomelidi (19 specie). Le altre sono un Ortottero Acridide, 4 Lepidotteri (1 Limantride, 1 Saturnide e 2 Piralidi) e 2 Imenotteri (1 Diprionide e 1 Tentredinide). A queste devonsi aggiungere i Lepidotteri, Iponomeutide *Hyponomeuta padellus* L. (VON WAHL 1916) e Glifipterigide *Simaethis nemorana* Hb. (FAGGIOLI, 1931), nonchè i Coleotteri Crisomelidi *Entomoscelis adonidis* Pall. (MANOLACHE, 1940), *Hydrothassa marginella* L. (RUFFO, 1938), *Colaphellus sophiae* Schall (MÜLLER, 1950) e *Phytodecta vulgatissimus* L. (FEYTAUD, 1912) (riportato da COUTURIER, 1938). Infine è apparsa discretamente parassitizzata, qui in Emilia, la *Phytodecta fornicata* Brugg. Crisomelide di recentissima comparsa in territorio italiano.

Le vittime non Crisomelidi sopranominate sono, con ogni probabilità (ad esclusione dell'*Athalia colibri* Christ), da ritenersi semplicemente occasionali visto che le relative segnalazioni appaiono del tutto non comuni e considerata d'altro canto l'estrema facilità (discussa più avanti) con cui le femmine della *Meigenia* si liberano delle uova che vengono man mano maturandosi.

(2) Una quindicina di anni or sono fu infatti introdotto negli Stati Uniti del Nord America per combattere il *Crioceris asparagi* L. (STRONG, 1940).

citati hanno dimostrato come la grande variabilità megetica (la quale come si sa è accompagnata di norma da una sensibile variabilità di altri caratteri) delle *Meigenia* dipenda dall'ospite in cui queste si sono sviluppate, essendo stata misurata, con tutti i valori intermedi, in una serie di sei specie di vittime, una lunghezza minima di mm. 2,8 in maschi sfarfallati dal Coleottero Crisomelide *Phaedon cochleariae* F. ed una massima di mm. 7,1 in maschi sviluppatisi in larve dell'Imenottero Tentredinide *Athalia colibri* Christ. Cade quindi uno dei caratteri (l'altro è il colore) su cui è impostata la distinzione tra *M. mutabilis* Fall. e *bisignata* Meig. (lunghezza di regola inferiore ai 5 mm. per la prima, variabile da 5 mm. ad 8 per la seconda).

Nel presente lavoro mi limito a riportare solamente i risultati originali delle mie ricerche. Per ogni altra notizia (ciclo annuale in rapporto agli ospiti, numero delle generazioni, elenco delle vittime più note ecc.) e per la bibliografia generale rimando al già citato studio di Kanervo e Talvitie. Anche sull'etologia, ben nota, della vittima qui considerata non credo opportuno soffermarmi tanto più che quanto ho veduto coincide con ciò che già si sa; basti quindi, a questo riguardo, consultare il dettagliato studio di Zucht (1934).

Ovideposizione

Verso i primi di giugno le femmine della *Meigenia* cominciano a deporre le uova sulle giovani larve di *Agelastica* (1). Risultano di solito preferite, quando tutti gli stadi della vittima coesistano, le minute larve della II età (2) che, gregarie, in file serrate di 30-40 individui ed anche più, erodono il parenchima fogliare stazionando di preferenza sulla pagina inferiore. Tuttavia uova possono essere facilmente deposte anche su larve della III età e perfino su quelle della I, ma in genere allorquando scarseggiano o mancano quelle della II. Normalmente infatti, sulla stessa pianta e nello stesso momento mentre le *Agelastica* alla II età risultano gremite di germi, quelle della III e della I appaiono pressochè indenni.

La deposizione delle uova si protrae fino a tutta la I decade di luglio abbracciando in tal modo un lungo periodo di tempo, pari a circa una quarantina di giorni. Del resto anche il ciclo dell'*Agelastica* si svolge molto a rilento

(1) Altri A.A. che hanno segnalato la *Meigenia* come parassita delle larve di *A. alni* L. sono: Bugnion, 1880 (citato da Kanervo e Talvitie, 1946), Schmidt (1935) e Kanervo e Talvitie (1946) che riscontrano una percentuale di parassitizzazione molto bassa.

(2) In un altro Crisomelide, il *Phaedon cochleariae* F., il Larvevoride, secondo Kanervo e Talvitie (1946), depone invece le uova su larve molto avanti nello sviluppo. Infatti mentre quelle della I età sono sempre indenni le altre sopportano un numero di germi progressivamente crescente con l'età. Anche Couturier (1938) rileva fatti simili su *Chrysomela decemlineata* Say. In laboratorio egli ha veduto che le larve della IV età portavano incollate un numero doppio di uova di *Meigenia* rispetto a quelle della III.

con sovrapposizione dei vari stadi di sviluppo. La fase di ovideposizione, ad esempio, si prolunga per oltre un mese e mezzo e così ai primi di luglio accanto a larve mature sono ancora presenti uova ed adulti in accoppiamento.

Per ovideporre la femmina del larvevoride si pone direttamente sul fitto gruppo delle vittime, ovvero subito a lato, ed, estroflessi gli ultimi uriti, che vengono ripiegati in avanti sotto l'addome, incolla prestamente un uovo sul corpo dell'*Agelastica*. Le larvette sorelle reagiscono in massa e molto vivacemente contro la *Meigenia* che le sovrasta; ancorate alla foglia con le zampe

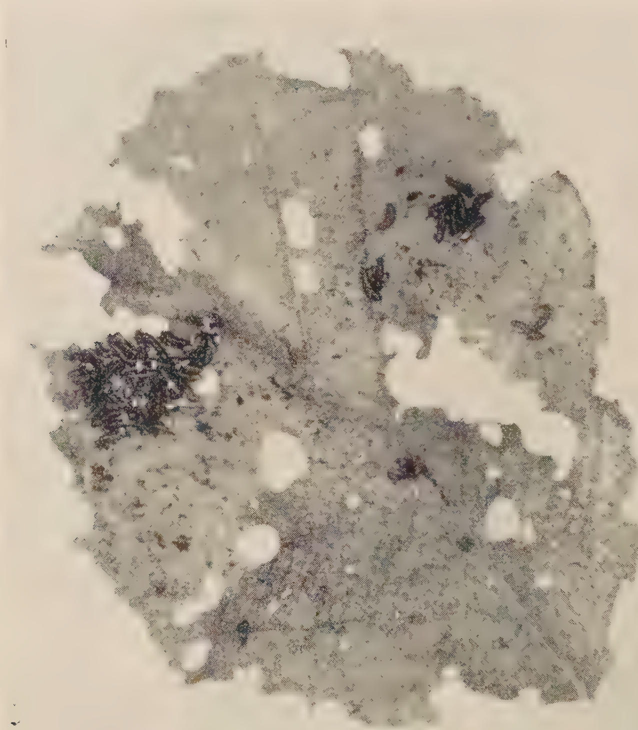


Fig. I – Gruppo di larve di *Agelastica alni* L. alla II età su foglia di Ontano. Alcune di esse sopportano l'uovo della *Meigenia mutabilis* Fall.

sollevano l'addome perpendicolarmente agitandole a più riprese. Tali operazioni si susseguono con ritmo smorzato per riprendere frenetiche ad ogni improvviso spostamento del larvevoride pronto per una nuova ovideposizione. La generale e quasi sincronica reazione delle larve di ciascuna ovatura fa un curioso effetto. Comunque il dittero procede nella bisogna deponendo più uova, a brevi intervalli, su individui diversi dello stesso gruppo senza mostrarsi gran che disturbato.

L'uovo risulta incollato sulla larva con tutta o quasi la sua superficie ventrale e sempre molto tenacemente oltrechè da una goccioletta di secreto proveniente dall'apparato genitale della femmina ovideponente, anche da sostanze emesse, sotto forma di minute gocce, da due serie di vescicole ghiandolari estroflettibili site ai lati del corpo, dalla vittima allorchè viene stimolata. Tali sostanze infatti conferiscono una gommosità generale al tegumento. E' pertanto difficile poter distaccare l'uovo, specialmente se si trova localizzato sulla superficie ventrale, senza lacerarne il corion, ovvero il tegumento piuttosto delicato della vittima. Qualche tempo dopo la deposizione nell'area circostante all'uovo la larva dell'*Agelastica* appare leggermente depressa, il tegumento tende ad imbrunirsi vistosamente rispetto ai territori circostanti già molto scuri, presentandosi nel contempo come raggrinzito e contratto. Queste caratteristiche si rendono vieppiù manifeste dopo che la larva è sgusciata. Si direbbe che, nelle aree interessate dall'ovideposizione prima e dalla cicatrizzazione poi, il normale sviluppo della larva rimanga ostacolato. Con la successiva

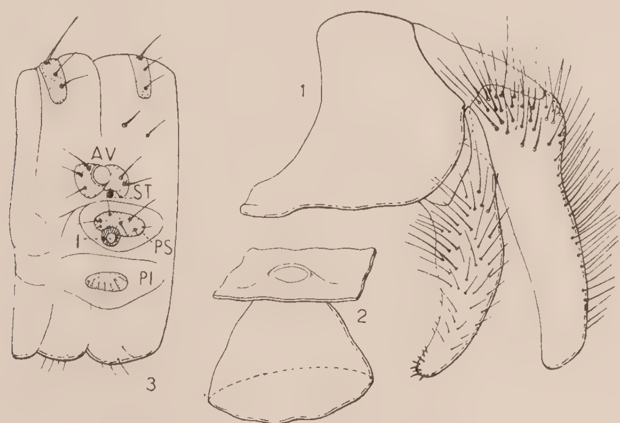


Fig. II - 1. *Meigenia mutabilis* Fall. Mesolobo e uno dei paralobi dei genitali esterni maschili in forme sfarfallate da *A. alni*. L. - 2. *M. mutabilis* Fall. Imbuto respiratorio di una larva di I età. - 3. *Agelastica alni* L. Quarto urite veduto di lato per mostrare ove vengono indotti, dalle larve di *M. mutabilis* Fall., i tubi respiratori: AV, armatura esterna delle vescicole ghiandolari estroflettibili; I, foro dell'imbuto respiratorio; PI, prominenza setigera inferiore; P S, prominenza setigera superiore; S T, spiracolo tracheale.

muta, che nonostante tutto procede di solito regolarmente, in genere queste alterazioni tendono a scomparire per quanto si possano talora notare, specie nei primi tempi, aree a tegumento teso, depigmentato, con aspetto cicatriziale laddove nell'età precedente erano fissati i germi. Le uova si trovano distribuite su quasi tutto il corpo dell'ospite, a cominciare dal limite fra capo e protorace fino all'estremità caudale, sia al dorso che al ventre, che ai lati, e spesso anche

in posizioni che possono sembrare poco adatte alla loro buona conservazione, come ad esempio tra le appendici ambulatorie, o tra capo e zampe protoraciche. Dal conteggio di 102 uova, 52 sono apparse localizzate al ventre, 39 al dorso e 11 ai lati. Risulta quindi che l'ubicazione ventrale è la più comune mentre la distribuzione nelle aree laterali è la meno frequente, per quanto una certa percentuale di uova, considerate come deposte al tergo od allo sterno, debordi in effetti verso i lati.

Se da un lato le uova sono tanto variamente ubicate, da un altro esse risultano invece orientate sempre nello stesso modo rispetto alla vittima e precisamente con il loro asse maggiore disposto normalmente, talora anche leggermente inclinato, rispetto all'asse longitudinale dell'*Agelastica*. Ciò in evidente relazione con la forma debolmente arcuata dell'uovo che può venire in tal modo, con la faccia ventrale concava, a perfetto contatto con il convesso tegumento dell'ospite. Non solo; in questa positura il germe risulta meno sollecitato dai movimenti di contrazione e di stiramento del tegumento della vittima quando questa si muove, movimenti che, come ben si comprende, alternandosi ritmicamente, potrebbero facilitare lo scollamento dell'uovo stesso dalla cuticola dell'*Agelastica*.

Le larve del nostro Crisomelide possono sopportare, in casi estremi, fino ad una ventina di germi ed oltre, ed apparire di conseguenza quasi integralmente ricoperte come da un bianco manicotto di uova. Più comunemente il numero di germi presenti su ogni larva è di 1-3. In generale si può dire che la superparassitizzazione è la regola (1) e che essa è sempre maggiore di quanto può apparire ad un semplice esame macroscopico, potendo l'ovideposizione ripetersi in tutte e tre le età della larva, e cioè anche dopo che, con le mute, i corion, vistosi indici della avvenuta parassitizzazione, vengono rigettati. Comunque l'esame di un gruppo di 40 larve parassitizzate della II età ha dato i seguenti risultati: 15 di esse sopportavano 1 solo uovo, 10 ne avevano 2, 9 si trovavano con 3, 3 con 4, 1 con 5, 1 con 6, 1 con 10. In questi ultimi casi alcune uova risultavano appena deposte, altre in uno stato d'incubazione più o meno avanzato, altre infine già schiuse.

Ciò che d'importante emerge da questi dati, che nel loro esatto valore numerico hanno un significato semplicemente indicativo, essendo suscettibili di enormi variazioni secondo il momento in cui vengono raccolti, è che le femmine della *Meigenia* depongono le uova senza minimamente curarsi se altri germi siano già presenti sulla stessa vittima o se addirittura nel lacunoma di questa si trovino già larvette vaganti, come di solito accade se la larva in corso di parassitizzazione è già avanti nello sviluppo. Ma non solo; l'indifferenza delle

(1) Ciò vale anche per le altre vittime. Ad esempio PAILLOT (1917) ha riscontrato, in un forte attacco di *Crioceris asparagi* L. presso Digione, che la maggioranza delle larve del Crisomelide sopportava 3-4 uova della *Meigenia*. RUFFO (1938) su una sola larva di *Crioceris* ne ha contate fino ad una decina e PANTEL (1910) fino a 27.

femmine della *Meigenia* nella ovideposizione va ben oltre. Esse depongono all'occorrenza i loro germi con estrema facilità anche su vittime non abituali, nelle quali le larvette neosgusciate possono trovarsi destinate a soccombere, come avviene nei casi di parassitizzazione della *Chrysomela decemlineata* Say osservati in natura da COUTURIER (1938). In laboratorio, poi, ZORIN (1931) ha veduto la *Meigenia* ovideporre sulle larve di *Galerucella viburni* Payk, sulle quali non era stata mai segnalata ed ha assistito al regolare sfarfallamento del dittero. PANTEL (1910) infine ha osservato la *Meigenia* deporre le uova addirittura su un Fasmoideo, una *Clonopsis gallica* Charp. morente. D'altro canto anche sulla stessa *Agelastica alni* L. l'ovideposizione viene praticata sulle larve che sono in quel momento disponibili, qualunque sia la loro età. Così nella primavera del 1954 il Larvevoride, comparso alquanto precocemente rispetto a questo Crisomelide (1), ha scaricato i suoi germi in prevalenza sulle larve della I età, mentre normalmente, come si è detto, sembra più attratto da quelle della II (2).

Tutto ciò dimostra che sotto lo stimolo delle uova che vanno maturandosi (e le femmine della *Meigenia* diventano mature in breve tempo, 3-4 giorni) il dittero se ne libera, in mancanza delle vittime abituali o dello stadio preferito, con estrema facilità e quasi senza discriminazione su ciò che capita. In cattività le femmine arrivano perfino, come ho potuto più volte constatare, ad ovideporre, qualora le larve ospiti siano scarse ovvero si siano rifugiate in luoghi inaccessibili, sulle foglie (3) ed anche in questo caso incollano regolarmente l'uovo con una gocciolina di secreto colleterico chiaro, trasparente (4). Le uova del dittero localizzate dorsalmente o lateralmente possono essere scorte con facilità anche ad occhio nudo sul corpo dell'*Agelastica* per le loro dimensioni e per il netto contrasto fra il loro colore bianco-latteo e quello della larva ospite, brunastro alla II età, quasi nero nella III.

Un'altissima percentuale di uova deposte va perduta per svariate cause. A parte il fatto che la larva di *Agelastica* permette lo sviluppo di una sola

---

(1) Sulla *A. alni* L. la *Meigenia* compie una sola generazione annuale e precisamente, sull'Appennino Tosco-Emiliano ove sono state condotte le ricerche, nel periodo che va dai primi di Giugno fino all'ultima decade di Luglio, periodo in cui si svolge l'unica generazione del Crisomelide. Gli adulti del Larvevoride che compaiono normalmente verso la fine di Maggio si sono evoluti evidentemente su altri ospiti e quindi può non esservi stretto sincronismo di apparizione fra il parassita e questa sua vittima.

(2) Le larve della I età sono ovviamente molto piccole mentre quelle della III si disperdono sulle foglie. Il principale fattore attrattivo per il dittero sarebbe dunque rappresentato dalla massa della vittima (in questo caso dalla massa globale della folla derivata da ogni singola ovatura) come del resto ha concluso COUTURIER, 1938) a riguardo della parassitizzazione di *Chrysomela decemlineata* Say (numero doppio di uova su larve della IV età rispetto a quelle della III pari in volume ad 1/4 delle prime).

(3) Fenomeni simili non sono del tutto infrequenti tra i Larvevoridi.

(4) In tali condizioni le larvette che sgusciano finiscono ben presto col disseccarsi.

Meigenia (1) e quindi tutte le uova soprannumerarie sono da considerarsi indirettamente perdute, altri fattori intervengono ancor prima a decimare fortemente i germi del larvevoride. Una piccola percentuale di uova soccombe per cause non precisabili durante lo sviluppo embrionale, una notevolissima aliquota per attività indiretta e diretta delle larve stesse. Intanto in occasione delle mute, con l'esuviamento, oltre ai corion sono spessissimo rigettate anche uova non ancora dischiuse (2) e le larvette che ne sgusciano, com'è comprensibile, sono destinate a perire. Ma ciò che appare veramente straordinario è l'attività diretta esplicata dalle larve di *Agelastica* contro i germi incollati sui loro tegumenti. Esse, incapaci di aggredire le uova deposte sul loro proprio corpo, mostrano una spiccata tendenza a lacerare il corion di quelle deposte sulle compagne immediatamente contigue. Più volte ho avuto modo, sia in natura che in laboratorio di osservare tale comportamento e un conteggio di 93 uova prese a caso ha portato a questo sorprendente risultato: solo 39 apparivano sane e vitali, 9 risultavano morte per cause non precisabili e ben 45 presentavano ampi squarci nella superficie dorsale del corion, praticati mutualmente dalle larve stesse (3).

La durata dell'incubazione è breve; da 24 a 48 ore circa.

Sgusciamento e comportamento della larva di I età

La larvetta fuoriesce dall'uovo dopo aver praticato con l'appuntito uncino boccale una stretta fessura longitudinale nella porzione subanteriore dell'esile superficie ventrale del corion. Contemporaneamente anche il sottostante tegumento della vittima viene inciso, di modo che la larva neonata può penetrare direttamente nel lacunoma dell'*Agelastica* senza mai venire a contatto con l'ambiente esterno. La piccola ferita nel tegumento della vittima rimane ben presto tamponata dall'emolinfa fuoriuscita, che in breve si solidifica in un resistentissimo zaffo brunastro. Il corion sovrastante continua a rimanere tenacemente accollato.

Le larve neonate migrano più o meno a lungo, secondo lo stadio dell'ospite, nell'emocele di questo, accrescendosi modicamente, pur rimanendo sempre alla I età, e senza intaccare i visceri dell'*Agelastica* che procede regolarmente nel

(1) In verità anche dalle larve di *Melasoma populi* L., che pure potrebbero, data la loro mole, servire di nutrimento ciascuna per due larve contemporaneamente, ho visto sempre sfarfallare un solo dittero per vittima. Ciò dipende, come si vedrà più avanti, dal particolare comportamento presentato nella prima età dalla larva parassita.

(2) L'incubazione ha invero breve durata, ma anche lo sviluppo della larva del Crisomelide nella II età è abbastanza rapido: in media 5 giorni.

(3) Non ho riscontrato altre cause nemiche della *Meigenia* per quanto le osservazioni siano state condotte su di un abbondantissimo materiale. Schmidt (1935) ha ottenuto da pupari, e proprio di *Meigenia* sviluppatasi a spese di *A. alni* L., un Icneumonide, il *Mesochorus thoracicus* Grav., vero iperparassita per l'innanzi ritenuto erroneamente parassita di Crisomelidi.

suo sviluppo senza mostrare, almeno in apparenza, alcuna alterazione. (1) E' in questo periodo di vita vagante che ha luogo la decimazione delle larvette sovrannumerarie. Come si è detto, molto di frequente nella stessa larva ospite possono trovarsi confinate più *Meigenia*, ma una soltanto, data l'esigua mole della vittima, può trovare il nutrimento necessario per compiere il proprio accrescimento (2).

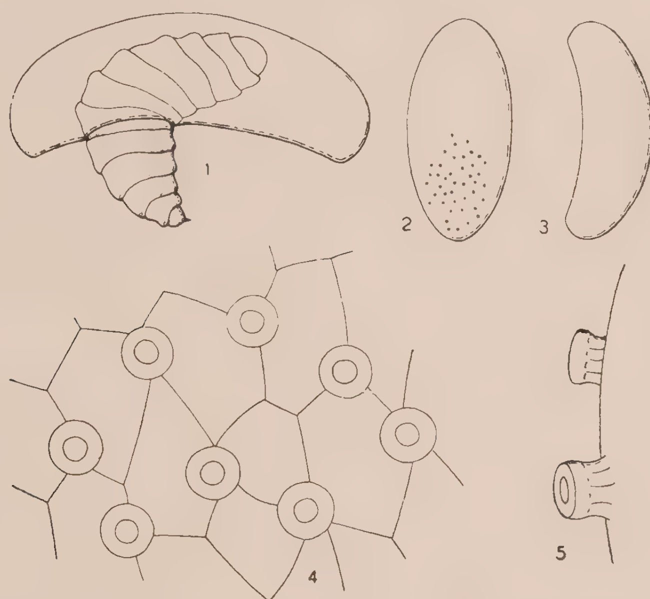


Fig. III. - *Meigenia mutabilis* Fall. - 1. Sgusciamento della larva. - 2. Uovo veduto dal dorso. - 3. Uovo visto di lato. - 4. Porzione di corion con micropili. - 5. Micropili visti di fianco.

Soltanto quando la larva dell'*Agelastica* è matura, e la decimazione dei parassiti concorrenti (3) oramai compiuta, la larvetta superstite, che frattanto si è sensibilmente accresciuta, pure restando alla I età, si appresta a perforare

(1) Secondo Pantel (1902) le larve di *Crioceris asparagi* L., poco tempo dopo la penetrazione del parassita ed ancor prima della formazione del tubo respiratorio, mostrano chiari segni di sofferenza: cessano di nutrirsi e scendono, o si lasciano cadere, sul terreno ove rimangono inerti.

(2) Anche negli altri Crisomelidi una sola larva del dittero riesce a svilupparsi per ciascuna vittima. Le decimazione, ripeto, appare un fatto costante anche in quei casi in cui, per la maggior mole dell'ospite, sarebbe possibile lo sviluppo contemporaneo di due *Meigenia*. Per una visione generale degli aspetti e dei problemi concernenti il parassitismo negli Insetti cfr. Grandi (1951).

(3) Insisto sulla precocità della decimazione poichè di solito, quando essa si verifica, le larve in soprannumero soccombono o vengono uccise, secondo Clausen (1940: cfr. pag. 434) nella II o III età.

il tegumento dell'ospite e ad indurre la formazione del tubo respiratorio. Questa regola è assoluta: mai infatti ho riscontrato tubi respiratori in larve giovani o anche in larve dell'ultima età, ma non mature, nè più di un tubo per ogni vittima.

La larvetta si insinua nell'apertura con l'ultimo urite che, avendo un diametro superiore a quello del foro, i cui margini ben presto si sclerificano, rimane nella metà posteriore fortemente strozzato. In seguito man mano il sifone si viene formando la larva abbandona il contatto diretto con l'esterno, permettendo in tal modo all'8° segmento addominale di riprendere la sua forma normale.

L'imbuto respiratorio si apre all'esterno con un minutissimo foro, quasi perfettamente rotondo, del diametro di circa 1/10 di mm. Esso è limitato da un sottile cercine sclerificato ed inoltre risulta aprirsi su di una piccola prominenza cupoliforme debolmente sclerificata. Il tubo all'interno si allarga ampiamente a campana presentando consistenza e pigmentazione pressochè uguale a quella di tutto il tegumento. Verso la fine della I età di solito l'imbuto appare prolungato in una membrana relativamente spessa e depigmentata che finisce per rivestire quasi completamente il parassita.

Mentre l'avvenuta parassitizzazione è un fatto evidentissimo quando sono ancora presenti le uova sul corpo della vittima, compiutasi una muta non rimane più alcun segno atto a stabilire la presenza all'interno del parassita. Soltanto quando la larva dell'*Agelastica* ha raggiunto la maturità è di nuovo possibile determinare se essa è parassitizzata o meno, poichè solo allora compare il foro dell'imbuto respiratorio che, per quanto minuto, può essere tuttavia individuato anche a modesto ingrandimento con un attento esame, apparendo come un'esigua macula bianca sul fondo nerastro della larva.

Mentre l'ubicazione dell'uovo sulla vittima è, pur entro certi limiti, indifferente, le posizioni in cui le larvette si fissano sono invece praticamente costanti. Innanzi tutto appare interessato soltanto l'addome, più precisamente le sue aree laterali, ed in queste esclusivamente la duplice serie delle prominenze setigere superiori, quella ad elementi più cospicui, sovrastata dalle armature sclerificate delle vescicole ghiandolari estroflettibili e limitata verso il basso da una serie di analoghe prominenze setigere ma più piccole. L'imbuto si può aprire nella cupoletta centrale leggermente sclerificata o accanto ad essa e quindi in posizione alquanto eccentrica rispetto al mammellone. In ogni caso mai ho riscontrato tubi respiratori fuori da queste aree (1).

Gli uriti nei quali la larva della *Meigenia* risulta di preferenza fissata

---

(1) Sulle larve di *Crioceris asparagi* L., secondo quanto riporta PANTEL (1902), la localizzazione degli imbuti respiratori appare invece molto varia: « cotés, dessus ou dessous du corps, toujours en un point exempt de plis et d'articulations ». Purtuttavia risulta, in linea generale, da questi reperti la tendenza della larva della *Meigenia* a scegliere quelle aree del tegumento ove la cuticola è meno sottile e delicata, tendenza che trova la sua massima espressione nella parassitizzazione dell'*Agelastica*.

sono il 4° e il 5°, ma anche negli altri, ad esclusione del 9° e del 10° (almeno nei casi da me osservati), si possono trovare imbuti respiratori, il cui numero decresce tuttavia progressivamente man mano ci si allontana dai due segmenti preferiti. Il conteggio di 59 tubi respiratori ha infatti dato i seguenti risultati: nel 1° urite 1 imbuto respiratorio, nel 2° 5, nel 3° 9, nel 4° 15, nel 5° 16, nel 6° 10, nel 7° 2, nell'8° 1.

Sviluppo ed impupamento

Dopo che si è fissata la larva si accresce rapidamente (1). Subita ben presto la prima muta essa attacca decisamente il tessuto adiposo e poi, entrata nella III età, tutti i visceri della vittima senza un ordine preciso di successione. Allorchè ha terminato di divorare gli organi antistanti ai suoi uncini boccali, riesce a rivoltarsi, nonostante che il diametro del corpo dell'*Agelastica* ed il proprio siano a un dipresso uguali, e svuota l'altra parte della larva. Data la particolare localizzazione degli imbuti respiratori la *Meigenia* è più frequente orientata nello stesso senso della vittima, quindi, per finire di nutrirsi, abbandonato l'imbuto, il che avviene soltanto nella III età, si dispone in senso inverso rispetto a quella. Tuttavia quando ha raggiunto la maturità torna di nuovo, nella maggioranza dei casi, ad isorientarsi con l'esoscheletro dell'ospite.

La durata dello sviluppo larvale dipende principalmente dallo stadio in cui trovasi la vittima al momento dell'ovideposizione. Se l'ospite è vicino alla maturità tale periodo è breve, di poco inferiore ad una settimana; se invece l'*Agelastica* parassitizzata è alla I età la durata dello sviluppo si allunga notevolmente poichè a questa devesi aggiungere, in base a quanto detto in precedenza, il periodo di tempo necessario alla larva ospite per divenire matura.

Le larve del Crisomelide, una volta mature, abbandonano gli Ontani per scavarsi una piccola celletta nel terreno ove impuparsi. Nel caso in cui siano parassitizzate esse tendono ugualmente a seguire questo comportamento. Talvolta tuttavia, quando siano già gravemente compromesse dall'attività dell'endofago, possono soccombere prima di avere iniziato l'escavazione del cu-

---

(1) Faccio notare che la *Meigenia* può svilupparsi regolarmente anche in vittime eventualmente paralizzate da Imenotteri Aculeati. Bott (1939) ha veduto spesso, da nidi di *Odynerus parietum* L., sfarfallare più o meno numerose (da un solo nido ne ha ottenute fino a 24!) le *Meigenia*. Queste Eumenidine, che approvvigionano i propri nidi con larve di Lepidotteri, possono infatti paralizzare e trasportare nei covi larve già parassitizzate dal Dittero (simili interferenze sono relativamente comuni: Grandi (1937), ad es., da larve di Lepidotteri Piralidi immagazzinate dal *Rhynchium oculatus* Spin. ha ottenuto nelle celle pedotrofiche, lo sfarfallamento di un Imenottero Braconide, il *Macrocentrus Grandii* Goid.). La larva del *Rhynchium*, se sgusciata quando già la *Meigenia* è avanti nello sviluppo, non è in grado di supplire al nutrimento divoratole, aggredendo quest'ultima ed in tal modo soccombe d'inedia. Il nostro larvevoride finisce così, per quanto indirettamente, coll'esplicare un'attività nociva anche ai danni di questo Vespide.

nicolo. Più frequentemente invece il larvevoride finisce di distruggerle allorquando esse si sono interrate e sono pronte per impuparsi.

Le larve mature del dittero, come si è detto, si isorientano regolarmente, salvo qualche eccezione, con la vittima entro le sue spoglie ed il più delle volte impupano avvolte nell'esoscheletro dell'*Agelastica*, nel quale viene praticata un'ampia fenditura nella superficie sternale del torace. Da tale fessura il pupario sporge più o meno con la sua metà cefalica. In certi casi il pupario può risultare anche completamente libero. Come ebbi modo di considerare a proposito della *Phytomyptera nitidiventris* Rond. (Mellini, 1954), che a questo riguardo si comporta similmente, la decisa tendenza delle larve mature del parassita ad isorientarsi con la vittima e la lacerazione della metà anteriore dell'esoscheletro di quest'ultima non appaiono giustificate da particolari difficoltà che si oppongono allo sfarfallamento del larvevoride.

Soltanto quando il parassita è entrato nell'ultima età le larve mature dell'*Agelastica* appaiono chiaramente parassitizzate: le alterazioni divengono sempre più appariscenti e la vittima si presenta contratta, torpida, striminzita nelle parti divorate, leggermente rigonfia nel tratto occupato dalla larva del parassita che è comparativamente tozza.

Il tubo respiratorio si è molto sviluppato sia in larghezza che in lunghezza rispetto a quello della larva alla fine della I età; il foro con l'esterno rimane naturalmente sempre minuto e parimenti le pareti del sifone appaiono esili e dello stesso colore del tegumento. L'imbuto conserva la forma a cupola che aveva inizialmente pur presentando delle strozzature annulari alternate a rigonfiamenti, corrispondenti agli ultimi uriti della larva. Nella II età, come avveniva nella I, il tubo si continua con una membrana, di solito debolmente pigmentata e cosparsa di fitte macchie, che racchiude come in un sacco tutta la larva ad eccezione del capo. Nell'ultima età la porzione membranosa dell'imbuto tende a scomparire lacerata ed accartocciata. La *Meigenia* ha la possibilità di penetrare più o meno profondamente in questa formazione. Comunque in ogni caso tra il foro esterno e l'estremità posteriore della larva parassita rimane sempre una cameretta relativamente ampia, data la sensibile larghezza dell'ultimo urite e quella minima del sifone verso la base. Gli spiracoli della *Meigenia* pertanto non vengono mai, dopo la formazione dell'imbuto, direttamente a contatto con l'esterno.

Nonostante la possibilità di abbondonare il tubo respiratorio la *Meigenia* vi rimane innestata fin verso l'ultimo periodo del suo accrescimento quando è costretta per terminarlo a voltarsi in senso opposto. Pertanto impigliate nelle sue pareti interne si trovano abbastanza di frequente le esuvie della I e della II età o, quanto meno, le loro porzioni caudali.

Lo sfarfallamento degli adulti avviene dopo una vita pupale media di circa una decina di giorni.

Uovo

E' da riferirsi al gruppo delle uova macrotipiche indeiescenti ed ha una forma particolare mirabilmente adatta a come viene deposto. Leggermente ricurvo ed un poco più attenuato verso il polo caudale, risulta convesso al dorso dove il corion, bianco-opaco, è più robusto ed elastico e concavo al ventre, ove l'involucro protettivo è comparativamente molto esile e trasparente. Il corion appare finemente reticolato (1), con maglie poligonali a 4-6 lati, di superficie alquanto variabile, ed in genere molto più ampia nell'area ventrale.

I micropili, presenti in numero vario, ne ho contati da un minimo di 28 ad un massimo di 45, risultano distribuiti, piuttosto irregolarmente, nella metà posteriore della superficie dorsale. Essi si trovano localizzati di solito nei punti ove convergono più vertici di poligoni adiacenti. Hanno struttura uniforme e ben definita: si tratta di prominenze subcilindriche poco più larghe che alte (mm. 0,015 × 0,011), terminanti in una formazione ad anello e con le pareti laterali rinforzate da pieghe verticali molto regolari.

L'uovo misura in media mm. 0,578 in lunghezza, mm. 0,272 nella larghezza massima e mm. 0,187 in spessore. Con il progredire dell'incubazione esso tende leggermente a deprimersi.

Larve della I età (2)

Alquanto raccorciata, tozza e sensibilmente attenuata anche verso l'estremità posteriore, si presenta di forma ovoidale, per quanto un pò piegata ad S. Fondamentalmente biancastra, mostra strette fasce di colore grigiastro vicino ai solchi intersegmentali, ove sono differenziate fitte serie di minute spinule. I vari segmenti appaiono più o meno profondamente invaginati e precisamente quelli toracici ed il capo in senso antero-posteriore e gli uriti 2° - 8° in senso postero-anteriore.

Lo *pseudocefalo*, di forma subconica, presenta bene differenziati gli organi sensoriali, ed in particolar modo quelli superiori, rappresentati da una formazione cilindrica piuttosto breve e sclerificata sormontata da una membrana cupoliforme molto prominente. Gli organi sensoriali inferiori, molto ravvicinati ai precedenti ed un po' spostati medialmente, sono costituiti da un'esigua area subellittica, leggermente rilevata, sulla quale risultano presenti alcune minutissime prominenze. Lo *scheletro cefalo-faringeo* (lungo mm. 0,14

---

(1) Nelle uova macrotipiche, secondo CLAUSEN (1940) lo è di rado.

(2) Tengo a precisare che anche lo studio della morfologia preimmaginale è stato condotto su materiale prelevato da *Agelastica alni* L. E' probabile infatti che una certa variabilità morfologica si presenti anche nelle larve, secondo gli ospiti in cui si evolvono. Del resto sensibili differenze si notano già a carico dello stesso materiale proveniente da *Agelastica;* basti considerare gli spiracoli tracheali posteriori di due larve mature, rappresentati nella Fig. VIII.

ed alto mm. 0,064 nella larva neonata, e rispettivamente mm. 0,24 e 0,07 verso la fine della I età), robusto (è lungo 1/3 dell'intera larva) (1), appare indiviso. La metà anteriore si attenua lentamente in un lungo uncino ricurvo, quella posteriore differenzia due lunghi ed ampi rami dorsali e due ventrali, di contro, oltremodo brevi e stretti. Nella larva neonata le piastre verticali superiori ed inferiori hanno a un dipresso lo stesso sviluppo; in seguito, sempre nel corso della I età, per progressiva sclerificazione della membrana nella quale i rami dorsali si continuano, questi si ampliano enormemente mentre quelli ventrali mantengono all'incirca le primitive dimensioni.



Fig. IV - *Meigenia mutabilis* Fall. - Larva della I età - 1. Larva veduta di fianco. 2. Spiracoli tracheali posteriori. - 3. Scheletro cefalo-faringeo della larva neonata. - 4. Scheletro cefalo-faringeo alla fine della I età.

Il *torace* è riccamente provvisto di spinule nella fascia anteriore di ciascun segmento. L'area occupata da tali produzioni cuticolari diminuisce progressivamente passando dal pro- al metatorace. Nel protorace la superficie in cui sono presenti le spinule abbraccia quasi tutta l'area ventrale per restringersi progressivamente verso quella dorsale; nel meso- e metatorace la distribuzione di questi microprocessi è alquanto diversa, nel senso che essi appaiono più diffusi al ventre e al dorso e meno nelle aree laterali, dove le fasce si restringono sensibilmente ad appaiono meno dense di spinule.

L'*addome* raggiunge il diametro massimo in corrispondenza del 3°-4° urite

(1) Si noti il forte sviluppo di questo organo nella I età comparativamente con le età successive. Nella III il rapporto tra la lunghezza dello scheletro cefalo-faringeo e quello della larva raggiunge appena 1/9.

dopo il quale appare progressivamente attenuato. Tutti i segmenti, escluso il 1°, si presentano modicamente invaginati in senso postero-anteriore ed in tutti, nelle superfici interessate da fenomeni d'invaginazione, sono differenziate minute spinule fittamente stipate in cospicue fasce al margine posteriore di ciascun urite (nel 1° anche a quello anteriore). Tali fasce, più ampie al dorso ad al ventre, tendono, come già si è visto nel meso - metatorace, ad esaurirsi ai lati ed inoltre ad ampliarsi procedendo verso l'estremità caudale. Gli urosterni 2°-6° risultano nella loro superficie mediana sensibilmente spostati in avanti. Negli stessi è differenziata, nell'area subanteriore, una stretta fascia di spinule costantemente più piccole di quelle prima considerate.

Gli *spiracoli tracheali posteriori* hanno forma subovalare con un diametro di circa mm. 0,0075 e si presentano parzialmente divisi in metà da una carena mediana. Le carene dei due spiracoli antimeri sono inclinate tra di loro di circa 90°. La distanza tra le due aperture stigmatiche è di circa mm. 0,022. La camera filtrante è esile e relativamente lunga (mm. 0,06).

Larva della II età

Differisce poco come forma generale da quella di I età; si presenta soltanto comparativamente più slanciata. Anche il colore del corpo e la distribuzione di microprocessi sono fondamentalmente gli stessi della larva I.

Lo *pseudocefalo* differenzia anteriormente due sensibili prominenze simmetriche sulle quali si trovano localizzati gli organi sensoriali, estremamente ravvicinati tra loro in ciascuna parte antimera, e costituiti nello stesso modo di quelli già considerati per l'età precedente. Lo *scheletro cefalo-faringeo* è, come nella I età, un pezzo integro (1). Esso risulta robusto e bene sclerificato; è lungo mm. 0,39 e raggiunge un'altezza massima di mm. 0,20. Gli uncini boccali sono forti e presentano ventralmente, alla base, una prominenza più o meno appuntita. I bracci dorsali appaiono come ampie lamine subrettangolari, fortemente divergenti in senso caudale (le loro estremità posteriori distano tra loro mm. 0,22). I rami ventrali sono più brevi, presentano una marcata insenatura al margine caudale e risultano medialmente fusi a formare una larga doccia.

Nel *torace*, al solito, i tre segmenti risultano più o meno invaginati, come il capo, in senso antero-posteriore. Le microspinule, discretamente robuste (lunghezza massima = mm. 0,01) risultano differenziate su di una base subellittica debolmente sclerificata ed appaiono in genere rivolte caudalmente. Esse sono presenti nella fascia anteriore di ogni segmento, nella porzione invaginabile. Le aree occupate dai microprocessi decrescono progressivamente passando dal

---

(1) Evenienza questa piuttosto rara nelle larve della II età.

pro- al metatorace e nello stesso segmento la maggiore diffusione interessa il tegumento ventrale, la minore quello laterale.

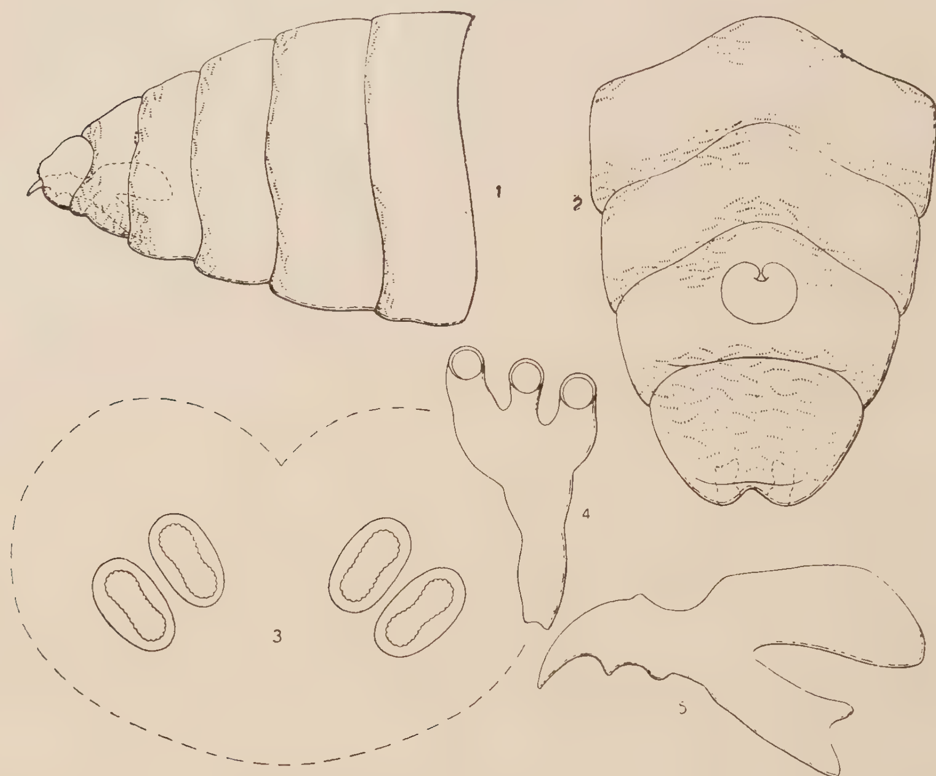


Fig. V - *Meigenia mutabilis* Fall. Larva della II età. - 1. Capo, torace e 1° 2° urite veduti di fianco. - 2. Ultimi uriti visti dal ventre. - 3. Spiracoli tracheali posteriori (la linea tratteggiata indica il limite dell'area priva di microspinule). - 4. Spiracolo tracheale protoracico. - 5. Scheletro cefalo-faringeo.

Gli *spiracoli tracheali anteriori* sono presenti, come di consueto, al margine posteriore del protorace latero-dorsalmente e talora appaiono ricoperti dalla duplicatura del tegumento risultante dall'invaginazione del pro- nel mesotorace. Constano di tre lobi per parte con aperture subcircolari del diametro medio di mm. 0,008. La camera filtrante, di colore bruno scuro, è lunga mm. 0,092.

L'*addome* raggiunge il suo diametro massimo in corrispondenza del 4°-6° urite. Il 1° segmento appare leggermente introflesso in senso antero-posteriore, e gli ultimi sei in senso postero-anteriore, ed in modo sempre più deciso procedendo caudalmente. Serie di spinule sono presenti nelle aree di tegumento invaginate o suscettibili d'invaginazione e precisamente al margine anteriore del 1° e 2° urite ed a quello posteriore, e, per quanto meno riccamente, anche a quello anteriore (quasi esclusivamente al ventre) dei cinque che se-

guono. L'ultimo segmento, ad esclusione dell'area circostante gli stigmi, appare tutto disseminato di tali microformazioni, al solito disposte in brevi righe di 3-10 od anche più elementi ciascuna. In generale si può ancora aggiungere che le spinule risultano più diffuse al ventre e negli ultimi uriti.

Gli *spiracoli tracheali* posteriori sono forniti, per parte, di due aperture subellittiche molto ravvicinate e con gli assi maggiori paralleli tra loro. Il diametro massimo è pari, in media, a mm. 0,037 e risulta inclinato di circa 45° rispetto al piano sagittale della larva. La distanza minima degli apparati stigmatici antimeri è di mm. 0,048. La camera filtrante, di colore giallo-bruno, è breve (mm 0,085) e larghetta (mm. 0,05).

L'apertura anale si apre in un'ampia placca depigmentata alquanto rigida, rispetto al tegumento, e completamente priva di microprocessi. Essa appare spostata molto in avanti, nel 7° urosterno.

Larva matura

E' lunga in media 6-7 mm. ed ha un diametro massimo, a livello del 4° urite, di mm. 1,8-2. Si presenta quindi in genere relativamente snella ed appare inoltre leggermente incurvata ad S. Colore fondamentale bianco-latteo, talora tendente al cremeo. Spinule (con larga base subellittica debolmente pigmentata e con

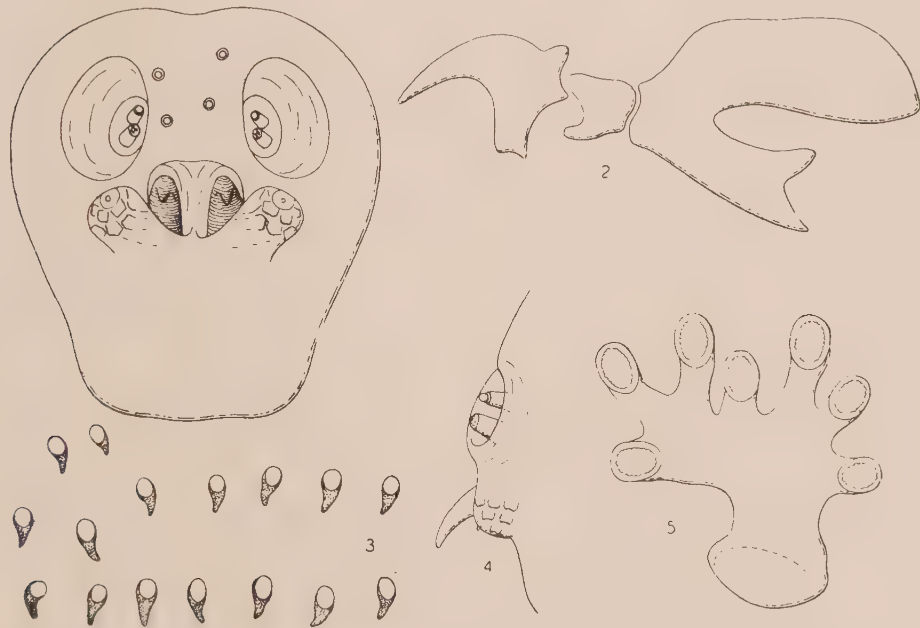


Fig. VI - *Meigenia mutabilis* Fall. - Larva matura. - 1. Capo veduto di fronte. - 2. Scheletro cefalo-faringeo. - 3. Spinule ventrali del mesotorace. - 4. Organi sensoriali e « palpo labiale » veduti di lato. - 5. Spiracolo tracheale protoracico.

punta ricurva e molto sclerificata) ben differenziate specie negli urosterni 2°-7° ove risultano disposte in vistose fasce traverse. Segmentazione del corpo bene distinta; più o meno evidenti i solchi secondari trasversi, debolmente accennati quelli longitudinali.

Lo *pseudocefalo,* al solito sensibilmente incassato nel protorace, presenta ai lati dell'apertura orale due grossi lobi (uno per parte) su cui sono differenziate una diecina circa di placchette di varia ampiezza, sfumate di colore rosso-bruno e coi margini latero-ventrali sporgenti in creste fortemente sclerificate e variamente denticolate. Tali lobi sono forniti all'apice di un'area rotondeggiante membranosa sulla quale sporge una minutissima prominenza (palpi labiali degli A.A.). L'antenna e il palpo mascellare di ciascuna metà antimera, vicinissimi tra loro, si trovano leggermente infossati in una concavità comune del pseudocefalo, concavità compresa in una vasta area subellittica che si estende, limitata da sottili pieghe, nell'area latero-dorsale. L'organo superiore (diametro × lunghezza = mm. 0,019 × 0,028) risulta costituito di due articoli leggermente sclerificati; il prossimale, bene sviluppato, ha forma subcilindrica, il distale molto minuto è subsferico. L'organo inferiore, di dimensioni leggermente maggiori (diametro × lunghezza = mm. 0,023 × 0,037), al solito uniarticolato, debolmente sclerificato esso pure e subcilindrico, presenta la superficie apicale, membranosa, disseminata di minutissime prominenze (7-9)



Fig. VII - *Meigenia mutabilis* Fall. - Larva matura. - 1. Capo e protorace veduti di lato. - 2. Ultimi uriti visti dal ventre

tra cui due con dimensioni nettamente maggiori e digitiformi. Medialmente a detti organi sono presenti 4 fossette rotondeggianti coi margini rilevati ad anello (papille degli A.A.). *Scheletro cefalo-faringeo* molto robusto (lunghezza × altezza massima = mm. 0,68 × 0,27) bene sclerificato e con le tre regioni

nettamente distinte ed articolate. Gli uncini boccali, fortemente ricurvi, differenziano posteriormente una grossa prominenza odontoide dorsale ed una lunga lamina ventrale distalmente biloba. Lo sclerite intercalare, di forma subtrapezoidale, se visto di lato, presenta una vasta insenatura antero-ventrale. Nell'armatura faringea, i bracci dorsali sono ampie lamine a cucchiaio, allargantisi e sensibilmente divergenti in senso posteriore (distanza minima = mm. 0,136, massima mm. 0,374); i rami ventrali, più brevi, risultano fusi ventralmente a formare un'unica lamina piegata a doccia; questa differenzia ai due margini postero-dorsali due corti bracci piegati verso l'esterno.

Torace. Tutti e tre i segmenti toracici risultano più o meno impegnativamente incassati in senso cefalo-caudale. La fascia anteriore di ciascun segmento, interessata dall'invaginazione, differenzia serie trasverse di spinule abbastanza cospicue (lunghezza media mm. 0,018) rivolte all'indietro. Tra capo e protorace tale fascia è molto larga al ventre, ove comprende 8-9 righe di spinule, si restringe ai lati (3-4 righe) e torna di nuovo ad ampliarsi al dorso (5-6 righe). Nel meso- e metatorace la fascia occupata dalle spinule, che sono più robuste e di un colore rosso-bruno più intenso di quelle del protorace, tende a mantenersi invece di altezza quasi costante e comprende in media 5-6 righe.

Spiracoli tracheali anteriori. I lobi spiracolari si aprono in una vasta placca ellittica, limitata da un esile solco, tangente posteriormente al margine dorso-laterale anteriore del mesotorace; tale placca trasparente ed incolore, come la restante cuticola, appare tuttavia alquanto rigida in confronto a questa. La camera filtrante breve, a forma di ventaglio, è di colore giallo-bruno. Il numero dei lobi è molto di frequente pari a sette ed uguale nelle due metà antimere dello stesso individuo; in alcuni casi se ne possono contare 5-6 od 8, ed anche in numero diverso nelle due metà. Le aperture di forma subellittica, disposte spesso a semicerchio e di grandezza a un dipresso costante, hanno un diametro massimo di mm. 0,022.

Addome. Mentre i primi due uriti appaiono leggermente introflessi in senso cefalo-caudale, gli ultimi quattro si mostrano debolmente invaginati in senso caudo-cefalico. Ricco il sistema delle spinule che appaiono così distribuite. Un anello al margine anteriore del 1° urite di altezza pressochè costante (4-5 righe) e del tutto simile alla fascia meso- e metatoracica. Negli uriti che seguono la distribuzione delle spinule cambia notevolmente. Nel 2° segmento la fascia è stretta al dorso (3 righe), si esaurisce bruscamente ai lati ove le spinule sono molto minute, rade e depigmentate, si allarga al ventre in un'ampia e vistosa area di aspetto semilunare che conta nel suo punto più largo 7-8 righe ad elementi piuttosto robusti (mm. 0,0185 in lunghezza). Negli uriti 3°-5° la situazione è sostanzialmente la stessa soltanto che si riducono di numero e di dimensioni le spinule dorsali, spariscono quelle laterali, mentre si ampliano le fasce ventrali che appaiono decisamente prominenti in una grossa piega semilunare. Nel 6° urite compaiono in più alcune serie di spinule verso il mar-

gine posteriore del tergo. Nel 7° le spinule posteriori si estendono tutt'attorno in una fascia comprendente 4-5 serie. L'8° urite, infine, appare, ad esclusione dell'area circostante agli spiracoli tracheali, integralmente ricoperto di brevi

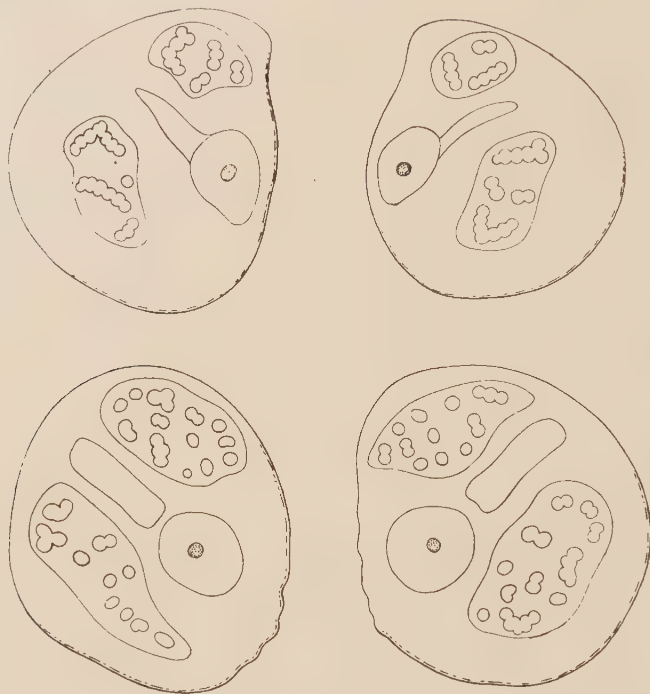


Fig. VIII - *Meigenia mutabilis* Fall. - Larva matura - Spiracoli tracheali posteriori di due esemplari.

righe, variamente inclinate, di spinule. Le spinule dell'addome, ad esclusione di quelle dell'ultimo urite, della fascia posteriore del 7°, di quella pure posteriore, appena accennata del 6° urotergo, appaiono quasi tutte più o meno rivolte all'indietro.

Gli *spiracoli tracheali posteriori* prominenti in due vistose formazioni a bottone, nere e sclerificate, hanno un diametro ed un'altezza massima rispettivamente di mm. 0,29 e 0,136. Risultano molto ravvicinati, distando le loro superfici mediali mm. 0,1. In ciascuno di essi si distinguono sovente 4 aree meno sclerificate di colore giallo-bruno: una subrotondeggiante corrispondente alla cicatrice degli spiracoli della II^a^ età; una mediana stretta e lunga, spesso fusa con la precedente; due ampie di forma grossolanamente ovalare quanto mai varia, nelle quali si apre, ramificandosi, la camera filtrante. Le aperture minute e subrotondeggianti dei rami tracheali possono risultare variamente raggruppate in serie lineari ovvero biforcate e comprendere quindi un numero variabile di elementi coalescenti od anche apparire isolate.

L'apertura anale è sita su di una vasta placca leggermente sclerificata e di forma ellittica a grande diametro trasverso. Tale placca come mostra la Fig. VII appare spostata nel 7° urosterno.

Pupario

Di colore rosso-bruno cupo, lungo in media mm. 5 e con un diametro massimo di mm. 2, risulta di regola parzialmente rivestito dalla cuticola grigio-



Fig. IX - *Meigenia mutabilis* Fall. - 1. Larva matura. - 2. Pupario (le linee tratteggiate indicano le linee di rottura).

nera della larva vittima, cuticola che, estremamente tesa per essere il diametro del pupario maggiore, aderisce come un esile velo. Dopo qualche tempo, quando le spoglie inguainanti ed il pupario si sono prosciugati, non è più possibile distaccarli risultando essi perfettamente incollati.

La segmentazione è poco evidente e quasi esclusivamente contrassegnata dalle fasce di microspinule presenti ai margini dei segmenti. Gli apparati stigmatici anteriori si presentano come due robuste prominenze quasi nere (derivate dalla sclerificazione di parte della camera filtrante) nelle quali si ergono, come altrettanti esili cilindretti, i singoli lobi. La placca anale della larva si mantiene distinta; è leggermente più scura rispetto ai territori circostanti, ed appare localizzata al margine posteriore del penultimo segmento. Gli stigmi posteriori si presentano come due formazioni subcilindriche brevi, molto ravvicinate, alte circa la metà del loro diametro, di colore nero lucente e localizzate verso la superficie dorsale del pupario stesso. La loro posizione, alquanto spostata in avanti rispetto alla norma, appare caratteristica.

L'immagine fuoriesce attraverso una spaccatura determinatasi secondo un piano frontale, ventralmente agli stigmi anteriori, nella cuticola dei primi tre segmenti. Il divaricamento delle due emicalotte determina delle fenditure trasverse alla base di queste, e più precisamente nella metà anteriore di quello che era il 1° urite. Queste spaccature nel loro complesso di solito non cingono ad anello tutto il segmento e così le due emicalotte rimangono attaccate al pupario, una dorsalmente, l'altra ventralmente, per breve tratto.

RIASSUNTO

La *Meigenia mutabilis* Fall., Larvevoride polifago, ma particolarmente legato a Coleotteri Crisomelidi, compie sull'*Agelastica alni* L. una sola generazione annuale e precisamente nel periodo che va dai primi di Giugno all'ultima decade di Luglio.

Le uova vengono deposte sul tegumento di tutto il corpo della vittima (capo escluso) più frequentemente nei suoi territori ventrali, meno in quelli laterali e sempre tenacemente incollate alla cuticola con una gocciolетta di secreto colleterico. I germi risultano di regola disposti col loro asse maggiore normale all'asse longitudinale della larva ospite, che può sopportarne un numero vario, fino ed oltre una ventina. Allorchè tutti gli stadi dell'*Agelastica* coesistono le uova vengono affidate di preferenza alle larve della II età, le quali, gregarie in gruppi di una trentina di individui, offrono in confronto con quelle della I che sono molto piccole, e con quelle della III che si disperdono sulle foglie, una massa notevole d'attrazione. Tuttavia la *Meigenia* può facilmente deporre anche su *Agelastica* della I e III età, nonchè su vittime non abituali, ed in laboratorio perfino sulle foglie, qualora gli ospiti siano scarsi od inaccessibili. Questi ed altri fatti dimostrano che sotto lo stimolo delle uova che vanno maturando il dittero tende a liberarsene con estrema facilità e quasi senza discriminazione a riguardo del supporto. Una forte percentuale di uova deposte va perduta, sia in occasione delle mute (con l'esuviamento, oltre ai corion, sono molto spesso rigettate anche uova non ancora dischiuse), sia per la spiccata tendenza, davvero sorprendente, delle larve di *Agelastica* a squarciare le uova del parassita poste sul dorso e sui fianchi delle compagne. Sono infine da considerarsi indirettamente perduti anche tutti i germi, fatta eccezione per uno, presenti sullo stesso ospite, poichè in ogni caso si sviluppa una sola *Meigenia*.

Le larve neonate penetrano nella vittima perforando il tegumento direttamente sotto i corion; vagano quindi nel lacunoma fino a quando l'*Agelastica* non sia matura e la decimazione delle larvette concorrenti compiuta. Allora inducono la formazione del tubo respiratorio, si fissano, ed in breve subiscono la I muta. Lo sviluppo da que-

sto momento è rapido. Gli imbuti respiratori risultano localizzati in posizioni costanti e precisamente nella duplice serie delle prominenze setigere superiori degli uriti 1°-8°, con frequenza maggiore al 4°-5° e via via decrescente verso il 1° e l'8°.

L'impupamento avviene di solito entro l'esoscheletro della vittima, che il più delle volte è riuscita a scavarsi la normale celletta nel terreno. Di norma il pupario è isorientato rispetto alle spoglie inguainanti, dalle quali sporge lievemente attraverso una spaccatura degli sterni toracici.

E' data una dettagliata illustrazione degli stadi preimmaginali.

SUMMARY

Meigenia mutabilis Fall. (*Larvaevoridae*), polyphagous, but feeding mainly on *Chrysomelidae* beetles, undergoes on *Agelastica alni L.* a single annual generation, i. e. between the beginning of June and the last decade of July.

The eggs are layed over the victim's integument throughout all the body (head excluded), more frequently on its sternites, less frequently on the sides and always tightly fastened to the cuticle through a drop of colleteric secretion. The eggs are usually arranged with their longer axis normal to the longitudinal axis of the host which can bear twenty eggs or more.

When all stages of *Agelastica* are present, the fly eggs are layed mainly on the second stage larvae which, in groups of about 30 each, offer to the parasitic fly a greater attraction than the small masses of first stage larvae and the single third stage larvae scattered on the surrounding leaves. However, *Meigenia* may easily deposit its eggs on first and third stage of *Agelastica* larvae, and on other unusual victims, and even on leaves in laboratory conditions, when hosts are scarce or unreacheable These and other facts show that, under the stimulus of the maturing eggs, the fly tends to lay them quite easily and almost without choosing the substratum.

A large percentage of eggs gets lost, either while the host is molting (during molts the insect often rejects, besides the chorion, also the unhatched eggs), or because the *Agelastica* larvae marked tendency, surprising indeed, to break off the parasitic eggs layed on the tergum or sides of its mates. All eggs present on one host must be also considered lost, except one, since a single fly only reaches maturity.

The new-born larvae penetrate into the victim by perforating the integument directly beneath the chorion; they wander then in the body-cavity until *Agelastica* reaches maturity and until the destruction of small larvae has occured. The respiratory funnel is formed at this stage, the larvae become fixed and in a short time they undergo the first molt. The larval development, from now on, is a very rapid one. The respiratory funnels thow to be localized in constant position, i. e. in the double series of the superior setigerous prominences of the 1-8 abdominal segments more frequently on the 4-6 abdominal segments, and decreasing in frequency toward the first and eighth abdominal segment.

Pupation usually occurrs within the host exoskeleton, while, as it frequently happens, the *Agelastica* larva has already succeeded in burrowing its usual cell in the soil. Normally, the puparium is oriented in the same direction as the host from which it slightly extrudes through a split of the thoracic sternites.

Detailed illustrations of the preimaginal stages are given.

BIBLIOGRAFIA

BARANOFF N. (1928): Die nach Hypopygiumbau geordneten in Serbien gesammelten Tachinidae. *Encycl. Entom. Ser. B Diptera, 4,* 31-34.

BOTT R. (1939): Die Lehmwespe *Odynerus parietum* und ihre eigenartige Vernichtung durch die Schmarotzerfliege *Meigenia floralis. Natur u. Volk, 69.* 542-547.

CLAUSEN C. P. (1940): Entomophagous Insects. Mc Graw-Hill Pub. Co. New York.

COUTURIER A. (1938): Remarques sur la tendance au parasitisme de *Meigenia mutabilis* Fall. sur le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Rev. Path. Veg. et Entom. Agric.*, *25*, 195-210.

FAGGIOLI D. (1931): Appunti entomologici. I. *Boll. Lab. Entom. Bologna*, *4*, 219-222.

GRANDI G. (1937): Contributi alla conoscenza degli Imenotteri Aculeati. XVI. *Boll. Ist. Entom. Univ. Bologna*, *9*, 253-348.

GRANDI G. (1951): Introduzione allo studio dell'Entomologia. Vol. I. Bologna.

KANERVO V. e TALVITIE Y. K. K. (1946): Studi sulla *Meigenia mutabilis* Fall. (in Finlandese). *Ann. Zool. Soc. Zool. Bot. Fenn. Vanamo*, *11*, 5 + 45.

MANOLACHE F. C. (1940): Cercetari morfologice, biologice si de combatere asupra insectei, *Entomoscelis adonidis* Pall. in Romania. *Teze Fac. Stiinte Bucuresti*, 2 + 205.

MELLINI E. (1954): Studi sui Ditteri Larvevoridi. I. *Phytomyptera nitidiventris* Rond. *Boll. Ist. Entom. Univ. Bologna*, *20*, 309-332.

MULLER F. P. (1950): Uber Schadauftreten und Biologie von *Colaphellus sophiae* Schall. (Chrysomel). *Zeitsch. Angew. Entom.*, *31*, 591-608.

NIELSEN J. C. (1911): Undersogelser over entoparasitiske Muscidelarver hos Arthropoder. I. *Vidensk. Medd. Dansk. Naturh. Foren.*, *63*, 1-26.

PAILLOT A. (1917): Note sur le Criocère de l'Asperge et ses Parasites. *Service des Epiphyties*, *4*, 335-336.

PANTEL J. (1902): Sur la biologie du *Meigenia floralis* Mg. (Dipt.). *Bull. Soc. Entom. de France, année* 1902, 56-60.

PANTEL J. (1910): Recherches sur les Diptères à larves entomobies. I. Caractères parasitiques au point de vue biologique, éthologique et histologique. *La Cellule*, *26*, 27-216.

RUFFO S. (1938): Studi sui Crisomelidi (Insecta Coleoptera). I. *Boll. Ist. Entom. Univ. Bologna*, *10*, 178-222.

SCHMIDT E. (1935): Ueber einen Fall von Sekundärparasitismus: Eine Ophionine aus der Tachine des Erlenblattkäfers. *Mitt. Deutsch. Entom. Ges.*, *6*, 7-10.

STEIN P. (1924): Die verbreitetsten Tachiniden Mitteleuropas nach ihren Gattungen und Arten *Arch. Naturgesch. Abt. A*, *90*, 1-271.

STRONG L. A. (1940): Report of the Chief of the Bureau of Entomology and Plant Quarantine, 1938-39. *Washington, D. C., U. S. Dep. Agric.*, 1-117.

VIMMER A. (1934): Beiträge zur Bestimmung der Tachinenlarven (Dipt.). *Acta Soc. Entom. Cechosl.*, *31*, 28-35.

VON WAHL C. (1916): Die Gespinstmotter. *Hauptstelle fur Pflanzenschutz in Baden an der Grossh. landw. Versuchsanstalt Augustenberg, Flugblatt* N. 5.

WAINWRIGHT C. J. (1932): The British Tachinidae (Diptera). First Supplement. *Trans. R. Entom. Soc. London*, *80*, 405-424.

ZORIN P. V. (1931): Guelder Rose Leaf-beetle (*Galerucella viburni* Payk). *Bull. Inst. Controlling Pests and Diseases*, *1*, 55-79.

ZUCHT G. (1934): Zur Biologie von *Ageiastica alni* L. *Deutsche Entom. Zeitschr.*, Jahrg. 1934, 145-218.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

COMPORTAMENTO MENDELIANO DELLA RESISTENZA ALLA AZIONE ABBATTENTE DEL DDT E CORRELAZIONE TRA ABBATTIMENTO E MORTALITA' IN *MUSCA DOMESTICA* L.

RICCARDO MILANI (*)

Premessa — Programma, materiale, metodi e nomenclatura — Fertilità e rapporto sessi — Decorso dell'abbattimento nei ceppi parentali e nelle F_1 — Decorso dell'abbattimento nelle F_2 inincrociate e reincrociate — Controllo del riconoscimento delle classi di segregazione — Segregazione del carattere resistenza all'abbattimento (kdr) *— Resistenza all'abbattimento e sopravvivenza — Ereditarietà del carattere* plexus. *(Cenni) — Carattere* plexus *e capacità di sopravvivenza — Riepilogo — Discussione.*

PREMESSA

La comparsa in seno ad una specie di popolazioni caratterizzate da una tolleranza eccezionalmente elevata verso una o più sostanze tossiche è un caso iniziale di differenziazione intraspecifica; come tale, comporta l'instaurarsi in popolazioni limitate di frequenze geniche nuove per la specie; tali frequenze tendono a nuovi equilibri che possono perdurare soltanto se corrispondono alle esigenze biologiche della popolazione e se esiste almeno un fattore di isolamento. La formazione di tali popolazioni può avvenire per processi spontanei oppure come conseguenza di processi selettivi determinati dall'uso di insetticidi. Il secondo caso è di gran lunga il più probabile; tuttavia il primo reperto di resistenza al DDT in *Musca domestica* (27) presumibilmente è da attribuirsi ad un processo spontaneo. Ambedue i processi di differenziazione sono possibili soltanto se preesiste eterogeneità genetica per i fattori in giuoco.

La comparsa di popolazioni di mosca domestica resistenti al DDT colse quasi di sorpresa nell'ultimo dopoguerra gli entomologi sanitari pur essendo una possibilità ben nota agli entomologi agrari. Questo fu naturale conseguenza della diversità nei rapporti tra ospite e parassita nei campi biologici oggetto di competenza specifica.

Nella tecnica agricola infatti a condizioni ottimali per l'ospite, generalmente corrispondono condizioni ottimali o favorevoli anche per il parassita; inoltre la lotta mira sempre a difendere e a colpire popolazioni grandi. Invece nelle presenti condizioni di vita delle popolazioni umane interessate alla lotta contro i propri parassiti, la vita dell'ospite si svolge in nicchie ecologiche generalmente impenetrabili — o difficilmente penetrabili — dagli insetti parassiti. Il parassitismo in tali condizioni rimane endemico; la lotta si svolge sul piano individuale e mira alla distruzione di popolazioni piccole della specie parassita in una porzione assai limitata del suo habitat: tali condizioni non sono favorevoli a processi di differenziazione intraspecifica per selezione.

(*) *Istituto Superiore di Sanità, Roma.*

Soltanto contro talune specie vettrici di agenti patogeni la lotta ha mirato alla eradicazione da regioni ampie, creando — con l'uso di insetticidi ad azione residua — isole impenetrabili al grosso della specie per immigrazione ed aperte a una colonizzazione senza competizione da parte di individui eccezionalmente dotati di particolari mezzi di difesa. Questi tentativi di eradicazione hanno generalmente coinciso — o per lo meno hanno avuto inizio — con eventi che, contrariamente alla difesa dei prodotti della terra, non rientrano nelle quotidiane attività dell'uomo. Fu proprio in occasione di questi eccezionali tentativi di eradicazione che l'entomologo medico ebbe non solo programmi simili ma anche esperienze eguali a quelle dell'entomologo agrario. La più clamorosa — ma non inattesa — fu la comparsa di popolazioni di mosca domestica (*Musca domestica* L.) resistenti al DDT. La prima constatazione di cui si abbia notizia ufficiale risale al 1946 ed è dovuta al Dr. SPEICH, che ad Arnaes (1000 km. a nord di Stoccolma) riscontrò la inefficacia di un prodotto commerciale a base di DDT. Questa osservazione non fu pubblicata dall'autore ma è citata nella estesa indagine sperimentale sulla DDT resistenza condotta — su un ceppo derivato dalla popolazione di Arnaes — da R. WIESMANN e pubblicata nel 1947 (27). In questo stesso anno fu accertata l'esistenza di mosche DDT resistenti anche nella zona del Delta Tiberino (23). Questi furono i primi reperti in natura ma in laboratorio il problema era già stato affrontato ed erano stati raccolti dati positivi sulla possibilità di selezionare ceppi resistenti, come soltanto nel 1948 A.W. LINDQUIST e H.G. WILSON renderanno noto (17).

Ai primi reperti in natura corrispondono tentativi di attribuzione di uno stato tassonomico: razza secondo WIESMANN, varietà secondo MISSIROLI (21) e SACCÀ (23). I tentativi di attribuzione di uno stato tassonomico presuppongono il riconoscimento (o la presunzione) della stabilità del carattere differenziale attraverso le generazioni, cioè della sua trasmissibilità ereditaria. Un passo del lavoro già citato di WIESMANN (27) indica che l'importanza dell'ereditarietà era ben chiara a questo autore: « Meiner Ansicht nach besteht die Gefahr, dass in Arnaes durch die DDT Behandlung der Staelle nach einer kuerzeren oder längeren Zeit eine Selektion im Sinne der absoluten Widerstandsfähigkeit der Fliegen erfolgt, ... ».

L'intossicazione può determinare una sintomatologia che inizia e si svolge in modo graduale e ordinato ed avere esito letale o no. E' ovvio che sintomatologia ed esito possono non essere correlati e che differenze di risposta alla intossicazione (e quindi di tolleranza) possono manifestarsi a questi due livelli.

In mosche sensibili il DDT determina gravi turbe nervose (eccitamento, incapacità di movimenti coordinati, paralisi) cui succede la morte. Le mosche resistenti possono essere classificate in due gruppi: *a*) con sintomatologia precoce e passeggera; *b*) con sintomatologia molto ritardata o nulla.

Nelle mosche di *tipo a*) l'intossicazione inizialmente decorre come nelle mosche sensibili, ma entro poche ore, se cessa il contatto con l'insetticida, viene superata; la sintomatologia di conseguenza si attenua sino a scomparire. Siccome lo stadio più caratteristico e chiaramente individuabile della intossicazione è l'incapacità di sorreggersi, possiamo dire che questo insetticida ha sulle mosche *sensibili* due azioni: abbattente e letale; sulle mosche resistenti del *tipo a*) ha solo azione abbattente; sulle mosche del *tipo b*) non ha alcuna azione oppure soltanto azione abbattente molto ritardata; a questo gruppo appartengono i ceppi altamente resistenti (2).

La possibilità di riconoscere l'appartenenza di un campione di mosche ad una di queste tre categorie è condizionata dalla tecnica sperimentale seguita.

L'esistenza di queste tre categorie di mosche era già stata riconosciuta e resa nota da BRUCE e DECKER (2). BUSVINE (4, 5) accertò che un ceppo di tipo *a*) ed uno di tipo *b*) differivano per proprietà fisiologiche. Il primo è in grado di decloridratare il DDT trasformandolo in DDE (19, 25, 26), il secondo no. BRUCE e DECKER in punti diversi del loro lavoro scrivono che tutti i ceppi altamente resistenti sono anche resistenti all'abbattimento e considerano la decloridratazione un importante meccanismo di difesa. Se ne può dedurre che sia stata studiata su ceppi resistenti all'abbattimento. Se così fosse vi sarebbe contrasto tra le osservazioni di BRUCE e DECKER e quella di

Busvine. La capacità di decloridratazione non sarebbe quindi una proprietà peculiare dei ceppi di uno dei due tipi *a*) o *b*).

Le ricerche genetiche sulla resistenza non sono molte, e furono rivolte a tre aspetti del problema: ereditarietà, selezione, rapporti tra resistenze ad insetticidi diversi. Ci occuperemo qui soltanto delle ricerche in cui fu analizzata l'ereditarietà. Gli autori che se ne occuparono non scelsero tutti lo stesso criterio per discriminare tra mosche sensibili e resistenti. Alcuni scelsero l'abbattimento, altri la mortalità. Il primo viene studiato saggiando i campioni con una dose fissa; lo sperimentatore stabilisce, dopo opportuna scelta, un vaglio che concede due possibilità alternative per ogni singolo individuo del campione: può o non può superare la prova; se non la supera, è necessario un tempo X perchè ciò avvenga. La seconda invece viene studiata determinando, con sottocampioni presunti rappresentativi ed esposti all'azione di dosi scalari, la frequenza nel campione di individui aventi determinate soglie di tolleranza. I reperti sono generalmente comunicati facendo riferimento alla dose che determina risposta positiva nel 50% dei casi (LD50 e dizioni similari). Tempo di contatto e intervallo fra trattamento ed accertamento dell'esito sono prestabiliti e costanti (1 h e 24 h rispettivamente). A queste si debbono aggiungere ricerche nelle quali i campioni sono stati sottoposti a prolungato contatto (24 ore) con l'insetticida e furono esaminati per l'esito al termine dell'esperimento (16).

Le ricerche del primo tipo hanno dato risultati che si accordano con l'ipotesi (od almeno la suggeriscono) che il carattere considerato (definito genericamente resistenza) sia geneticamente monofattoriale incompletamente recessivo (10, 14) o dominante (18).

Le ricerche del secondo tipo invece hanno portato all'ipotesi che la resistenza sia un carattere geneticamente complesso e influenzabile da fattori estrinseci (2, 16). Da quanto abbiamo visto sopra risulta evidente che nei due casi il termine « resistenza » indica fatti e proprietà tra loro diversi. L'attenzione su questo punto fu chiaramente richiamata da Busvine (5) e C.M. Harrison (11) cui spetta pure il merito di avere pubblicato i primi dati numerici sulla ereditarietà della resistenza allo abbattimento e di avere riconosciuto la monofattorialità del carattere preso in esame fornendo una chiara ostensione dei dati sperimentali (10).

L'accordo fra i risultati delle ricerche sull'abbattimento appare tanto più significativo quando si ricordi che gli esperimenti vennero compiuti su ceppi e con metodi diversi. Maeltzer e Kirk praticarono l'applicazione topica di insetticida in dosi note mentre gli altri autori usarono la tecnica del contatto tarsale. Una sola discrepanza tra i risultati merita rilievo: Harrison e Keiding osservarono recessività incompleta mentre Maeltzer e Kirk osservarono dominanza del carattere « resistenza ». L'uso di ceppi geneticamente eterogenei e il considerare abbattimento e morte come due manifestazioni di una stessa proprietà osservata in momenti diversi determinano incertezze interpretative e giustificano la cautela con cui gli autori esprimono le conclusioni cui i dati sperimentali portano (14, 18).

La sopravvivenza a dosi scalari in popolazioni discendenti da incroci fra ceppi sensibili e ceppi resistenti fu esaminata da Bruce e Decker e da Norton R. J. (2, 22). In ambedue i casi la prima generazione è descritta come avente tolleranza intermedia a quella dei ceppi parentali; tale livello di tolleranza fu mantenuto nelle generazioni successive controllate fino alla decima da Norton e fino alla quattordicesima da Bruce e Decker. Questi ultimi autori fecero incroci di massa e interpretano i loro dati come prove di multifattorialità. Non ho potuto avere visione del lavoro di Norton: dalla rassegna da me consultata (22) non risulta che l'autore si sia impegnato con interpretazioni del meccanismo genetico dei fatti da lui osservati. Tra questi, nel complesso corrispondenti a quelli descritti da Bruce e Decker, meritano rilievo il controllo della corrispondenza genetica tra ceppi resistenti di diversa origine e l'avere osservato persistente differenza nel grado di tolleranza in incroci reciproci.

Anche le ricerche della Prof. L. La Face (16) e di D'Alessandro e colleghi (8, 9) inducono gli autori a considerare il carattere « resistenza » (intesa come capacità di

sopravvivenza al contatto tarsale con dosi elevate di DDT) carattere polifattoriale influenzabile da fattori ambientali. La Prof. L. LA FACE saggia i campioni in esame con 24 ore di contatto con superfici trattate, mentre D'ALESSANDRO e MARIANI controllano il tempo necessario per la caduta in supinazione senza ripresa del volo; considerano tale condizione prova certa di futura morte; pubblicano percentuali riferite alla caduta a tempi determinati e concludono che «...appare evidente dai nostri esperimenti che gli alleli "resistenza" e "sensibilità" non si comportano quali unità come è nella tipica eredità mendeliana; ci troviamo bensì di fronte ad una polimeria di caratteri» (9). Le ricerche citate rappresentano gli sviluppi delle prime constatazioni della ereditarietà della DDT resistenza comparse nelle letteratura (7, 15).

I risultati delle varie ricerche concordano dunque in un solo punto: gli autori che hanno scelto il tempo di abbattimento come elemento discriminante del grado di tolleranza hanno ottenuto indipendentemente dalla tecnica di trattamento e dai ceppi usati risultati che provano o suggeriscono l'esistenza di un gene incompletamente recessivo (10, 14) o dominante (18) capace di conferire un elevato grado di resistenza ai suoi portatori. I rapporti genetici esistenti fra le due manifestazioni di resistenza (tipo *a* e *b*) non risultano tuttora analizzati benchè già nel 1950 fosse stato segnalato da BRUCE e DECKER che è necessario distinguere tra paralisi e morte e che un elevato grado di tolleranza è sempre accompagnato da resistenza all'abbattimento. Le due manifestazioni di resistenza sono risultate geneticamente distinguibili (5, 11, 12); differenze fisiologiche nel metabolismo del DDT sono state accertate tra ceppi di tipo *a*) e *b*) (4).

Il disaccordo tra gli autori che hanno condotto ricerche genetiche sulla DDT resistenza deriva dunque in parte dall'avere considerato aspetti diversi, in parte dall'avere trascurato le acquisizioni raggiunte dai ricercatori precedenti e anche dalla metodologia seguita.

Ritengo perciò che un ulteriore contributo sperimentale alle conoscenze in questo campo non sia superfluo.

PROGRAMMA, MATERIALE, METODI E NOMENCLATURA

Programma. Il piano di lavoro fu studiato per analizzare i seguenti punti:

1) comportamento ereditario della resistenza all'abbattimento riscontrata in un ceppo selezionato per un carattere morfologico (anormalità di tipo *plexus* alle venature alari);

2) rapporti esistenti tra resistenza all'abbattimento e capacità di sopravvivenza;

3) ereditarietà del carattere *plexus*;

4) rapporti genetici tra i caratteri *resistenza all'abbattimento* e *plexus* comuni in popolazioni naturali di regioni abbondantemente trattate con il DDT.

Il punto 3) sarà soltanto sommariamente considerato nel presente lavoro essendo estraneo al problema di cui ci occupiamo.

Materiale.

Ceppi. Furono usati tre ceppi, di cui uno resistente all'abbattimento ed alla azione mortale del DDT (*kdr; plx*) e due sensibili (+ *Tripoli*, + *arancio*). Il ceppo *kdr; plx* deriva da una singola femmina fecondata raccolta a Latina e fu sottoposto, nelle prime generazioni, a forte pressione selettiva allo scopo di aumentare la penetranza e la espressività di un carattere mutante delle vene alari (venuzze soprannumerarie talora a reticolo, ispessimenti e irregolarità varie sulla vena trasversa posteriore). Per tre volte nella storia del ceppo i riproduttori furono limitati ad una sola femmina fecondata (parentale) o ad una sola coppia (F_7, F_8). Il grado di inincrocio è quindi molto elevato. In laboratorio questo ceppo non ebbe mai contatto con il DDT; ciò nonostante

risultò omogeneo e altamente resistente sia all'azione abbattente, sia all'azione letale di questo insetticida. Fu controllato in 5 occasioni diverse prima degli esperimenti qui descritti esponendo campioni al contatto con depositi di 1 gr/m² su superfici di vetro. I primi sintomi di intossicazione comparvero sempre dopo almeno 6 ore di contatto. In occasione di un trattamento con soluzione oleosa su carta (vedi oltre) i primi sintomi comparvero dopo 14 ore. In tutti i casi dopo 24 ore alcuni individui non manifestarono ancora sintomi.

Il ceppo + *Tripoli* deriva da alcuni individui raccolti in natura presso Tripoli e fu sempre mantenuto in coltura di massa (*). All'inizio degli esperimenti era alla 14ª generazione. I controlli effettuati (depositi su vetro 1 gr/m²) prima degli esperimenti provarono che dopo 15' di contatto la caduta è già in atto e dopo 30' (in un solo caso 60') ha coinvolto tutti gli individui esposti. Fu scelto come ceppo normale sia perchè in esso non furono mai osservati i caratteri presenti nel ceppo *kdr*; *plx* sia perchè proviene da una popolazione naturale separata da quella originaria del ceppo *plx*; *kdr*. Questo rende improbabile che processi selettivi o di deriva genetica abbiano determinato situazioni genotipiche tali da rendere speciosi i reperti sperimentali.

Il ceppo +*arancio* (addome chiaro, aranciato) fu scelto per la ragione opposta; deriva da una femmina fecondata proveniente dalla stessa popolazione del ceppo *kdr*; *plx* ed ha quindi probabilità di appartenere alla stessa comunità genica. Subì inizialmente selezione per il colore del corpo, ed ai controlli risultò sensibile alle azioni del DDT e omogeneo. La caduta è in pieno sviluppo dopo 15'-20' di contatto e termina entro 35-55' (5 controlli con deposito su vetro, 1 gr/m²); quattro trattamenti con soluzione oleosa su carta diedero in tre casi inizio e termine di caduta entro 15' e 35' rispettivamente e in due entro 30' e 75'

Tecnica di allevamento e di incrocio.

Le tecniche di allevamento e le modalità di incrocio saranno considerate in modo particolareggiato in altra nota. Mi limito qui a precisare che le ovodeposizioni furono raccolte su cotone bagnato di latte; lo sviluppo larvale si svolse in terreno colturale formato di crusca, latte in polvere e acqua (2000 : 120 : 1000); l'impupamento avvenne in sabbia. Gli individui destinati agli incroci furono prelevati entro la prima ora dallo sfarfallamento onde evitare che accoppiamenti incontrollati interferissero con il piano degli esperimenti.

Trattamento con il DDT.

Scelsi come metodo di trattamento il contatto tarsale con superfici trattate poichè la quantità di sostanza attiva che agisce su ogni individuo viene introdotta nell'organismo attraverso le vie, e approssimativamente nelle dosi, che in condizioni non sperimentali hanno rivelato l'esistenza di soglie di tolleranza diverse all'interno di popolazioni naturali e ne hanno cambiato per selezione la frequenza; inoltre il numero dei campioni e degli individui che possono essere trattati ad ogni prova è praticamente illimitato e quindi il piano di ricerca non è soggetto a limitazioni di natura puramente tecnica.

Per rispondere ai quesiti proposti (pag. 516) bisogna accertare sia il tempo necessario perchè si verifichi l'abbattimento, sia la correlazione fra tempo di caduta e mortalità.

I saggi furono eseguiti usando due attrezzature e due tecniche di efficacia provatamente molto vicina (vedi le notazioni sulla resistenza dei ceppi a pag. 516). I ceppi parentali, le F_1 e le F_2 allevate in massa subirono i trattamenti entro gabbie cubiche (cm. 38 di lato) con 5 pareti di vetro ed il fondo a tramoggia già in uso in questo laboratorio; le F_2 ottenute da coppie singole furono trattate entro coni di carta da filtro impregnati con soluzione oleosa di DDT (vedi fig. e didascalia) sorretti da im-

(*) Questo ceppo mi fu dato dal Prof. G. Saccà, che sentitamente ringrazio (R. M.).

buti di rame. Le gabbie e gli imbuti sono dotati di una valvola girevole — suggerita dal Dott. E. Mosna — che consente di prelevare gli individui abbattuti senza disturbare il decorso del trattamento. Questo accorgimento consente di suddividere ogni lotto in frazioni delle quali è noto l'ambito di tempo in cui l'abbattimento è avvenuto. Al termine del trattamento gli individui attivi possono essere prelevati anestetizzandoli con CO_2.

Per accertare la incidenza della mortalità nelle varie frazioni delle popolazioni, gli individui abbattuti — raccolti ai tempi stabiliti — rimangono, forniti di acqua e zucchero in zolle, in recipienti di vetro in attesa dell'esito della intossicazione (*).

Il conteggio dei morti e dei sopravvissuti e il riconoscimento del sesso furono effettuati 48 ore dopo il trattamento, eterizzando i sopravvissuti. Tale intervallo, superiore a quello di uso generale (24 h.), è necessario e sufficiente perchè tutti gli individui capaci di tollerare la dose ricevuta si ristabiliscano perfettamente ed i morti secchino facilitando notevolmente la cernita.

Il prelevamento degli individui paralizzati fu fatto, nei trattamenti in gabbia, ad intervalli brevi per delineare il procedere dell'abbattimento nei ceppi d'origine, nelle F_1 e nelle F_2 ed avere così la possibilità di stabilire il criterio di discriminazione tra individui sensibili e resistenti nelle popolazioni miste (F).

Le F_2 ottenute da coppie singole furono lasciate a contatto con le superfici trattate per 1 h e 45' (vedi oltre); dopo questo intervallo furono prelevati gli individui abbattuti. Il prelevamento degli individui resistenti con anestesia da CO_2 seguì dopo altri 15': questa pausa fu interposta per accertare l'inizio del periodo di stasi nella caduta.

Il DDT usato fu DDT tecnico (pp' > 80%) e le dosi furono mgr. 0.1/cm² sulle superfici di vetro e mgr. 0.40/cm² nella carta da filtro.

I solventi scelti furono benzolo per i depositi su vetro e miscela di olio Shell Risella 117 e etere etilico (1 : 2) per l'impregnazione della carta da filtro (Carta Wathman n. 2, in dischi di cm. 24 di diametro).

L'impregnazione della carta fu fatta seguendo la tecnica consigliata da Busvine e Nash (6) adattata come segue:

1) la carta fu n. 2 anzichè n. 1 per motivi di disponibilità al momento degli esperimenti;

2) la soluzione di DDT fu fatta direttamente nella miscela di olio ed etere per superare il limite di solubilità del DDT nell'olio minerale;

3) il residuo oleoso per unità di superficie è stato aumentato per la diversa porosità della carta (mm³ 4.4/cm²).

La dose fu scelta dopo aver sperimentalmente accertato che fosse di efficacia uguale o molto vicina a quella del residuo cristallizzato sulle pareti di vetro delle gabbie.

I trattamenti furono fatti con mosche di 5 giorni di età.

Gli esperimenti furono eseguiti in un locale non termoregolato mantenuto a 25°C. e si svolsero nel periodo 4 dicembre 1953 - 24 febbraio 1954.

Nomenclatura. La espressione «resistenza all'abbattimento» traduce la locuzione «knock-down resistance» ed è usata con le stesse accezioni, cioè nel significato letterale e per indicare un ben definito carattere fisiologico, geneticamente monofattoriale. Questo carattere, nella prima descrizione (10), fu denominato *knock-down resistance* perciò conservo tale nome al locus ad esso corrispondente; indico i due alleli noti *kdr+* (allele normale, incompletamente dominante: determina caduta precoce al contatto con DDT) e *kdr* (incompletamente recessivo, allo stato omozigote determina notevole ritardo nella caduta per intossicazione da DDT).

(*) E' opportuno che i recipienti di raccolta, oltre ad essere forniti di acqua e zucchero, abbiano il fondo ricoperto di carta bibula che assorba le deiezioni e il rigurgito emessi durante le contrazioni; l'affollamento non deve essere tale da causare stretto contatto o sovrapposizione di individui.

Le espressioni « capacità di sopravvivenza » e « resistenza alla azione mortale » sono sinonimi e traducono « kill-resistance ».

Nelle descrizioni degli incroci (tabelle) i segni di ♀ e ♂ talora sono ripetuti: indicano allora colture di massa; negli altri casi indicano coppie singole. Gli incroci sono descritti precisando il sesso e il ceppo di appartenenza (oppure l'incrocio d'origine) degli individui usati.



Imbuto a valvola per ricerche sull'abbattimento. - L'imbuto, di lamiera di rame, è largo superiormente cm. 20,5; ha una apertura inferiore di cm. 4, chiusa da un disco girevole che da un lato appoggia su un nottolino d'arresto. Alla superficie interna aderisce un cono di carta da filtro uguale a quello visibile nella fotografia. I due coni delimitano la camera di contatto, e sono ottenuti da dischi di carta da filtro (diametro cm. 24) dopo l'impregnazione col DDT. Una apertura al vertice, ottenuta asportando un dischetto centrale di cm. 4,5 prima della confezione, corrisponde nel cono inferiore (interno) alla valvola girevole e nel cono superiore permette l'introduzione dei campioni; una capsula di vetro di larghezza opportuna chiude l'apertura superiore e permette di osservare l'interno.

Fertilità e rapporto sessi

Le osservazioni qui riportate si limitano alla fertilità intesa come numero di individui adulti ottenuti da una singola ovodeposizione ed al rapporto tra i sessi; pur non essendo strettamente pertinenti ai problemi in esame, danno

TABELLA 1.

Fertilità e rapporto sessi.

Serie sperimentale	Tipo di incrocio in F_1	Omogeneità fra sessi	F_2 Individui esaminati			Ipotesi: *kdr* monofattoriale recessivo					
						Segregazioni mendeliane			Omogeneità tra colture		
		χ^2	Tot.	*kdr+*	*kdr*	*kdr* attesi	χ^2	P	χ^2	gl.	P
fs	♀♀ X ♂♂ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr; plx*)	$< 10^{-4}$	889	678	211	222,25	0,77	0,38	—	—	—
5	♀♀ X ♂♂ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr;plx*)	$< 10^{-3}$	365	282	83	91,2	0,99	0,30	1,04	1	0,30
6	♀ X ♂ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr;plx*)	1,60	265	223	42	66,2	11,83	$<10^{-3}$	10,14	2	0,003
7	♀ X ♂ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*)	0,30	169	137	32	42,2	3,31	0,07	4,54	3	0,20
8	♀ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr; plx*) X ♂ *kdr;plx*	0,52	70	35	35	35	—	—	0,93	1	0,32
9	♀♀ F_1 (♀ *kdr; plx* X ♂ + *Tripoli*) X ♂♂ *kdr;plx*	0,77	232	119	113	116	0,15	0,7	—	—	—
10	♀ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*) X ♂ *kdr;plx*	0,13	104	54	50	52	0,16	0,68	0,46	1	0,50
11	♀ *kdr;plx* X ♂ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*)	$< 10^{-3}$	95	61	34	47,5	7,64	0,005	0,32	2	0,85
12	♀♀ X ♂♂ F_1 (♀ *plx;kdr* X ♂ + *arancio*)	0,33	36	27	9	9	—	—	—	—	—
13	♀ X ♂ F_1 (♀ + *arancio* X ♂ *kdr; plx*)	2,42	706	471	235	176,50	25,85	$< 10^{-6}$	31,22	7	$< 10^{-4}$
14	♀ F_1 (♀ + *arancio* X ♂ *kdr;plx*) X ♂ *kdr;plx*	0,78	313	149	164	156,50	0,71	0,4	2,00	3	0,58
	Totali		3244	2236	1008	1014,35					

un quadro generale del materiale su cui la sperimentazione è stata condotta. I dati sono presentati nelle tabelle 1 e 2. Nella Tabella 1 le colture sono raggruppate in serie, che differiscono fra di loro per il tipo di incrocio e/o per le modalità di allevamento (coppie isolate o massa): per ogni serie è indicato il numero di coppie feconde, di ovodeposizioni fertili e di individui esaminati suddivisi per sessi. A questi dati seguono le statistiche sulla fertilità (media delle ovodeposizioni ± errore standard) e sulla normalità del rapporto tra i sessi; questa è misurata dal chi^2_s per i valori cumulati di ogni serie e da chi^2_{int} per l'omogeneità tra i dati parziali (colture): nel secondo caso sono indicati anche i gradi di libertà e la probabilità che campionamenti casuali diano differenze maggiori). Infine è indicato il numero di colture di ogni serie in cui fu riscontrato un rapporto sessi significativamente diverso da uno. La fertilità media nel complesso non è molto elevata; ha i valori maggiori nelle colture ottenute da ♀♀ + *arancio* e dalle loro figlie (serie 3; 13; 14); i valori minori corrispondono a colture ottenute da ♀♀ *kdr; plx* (serie 4; 11).

Il rapporto tra i sessi è significativamente diverso da uno solo in due serie (7 e 13; $chi^2_s > 3{,}84$); anche in questi due casi i valori parziali (colture) risultano tra loro omogenei, e denotano sitematicità nell'errore (eccesso di maschi nella serie 7, deficienza nella serie 13); tuttavia le due serie includono colture nelle quali le differenze numeriche tra i sessi sono significative.

Il saggio del chi² ammette una probabilità massima di errore del 5%; quindi su 54 campioni soltanto 2 o 3 dovrebbero per puro caso superare il valore limite. Su un totale di 54 colture ottenute da coppie singole, 6 hanno presentato un rapporto tra i sessi significativamente diverso dal normale. Questo numero è quindi maggiore della tolleranza ammessa dal saggio applicato. I sei casi anormali sono presentati nella Tabella 2, nella quale compaiono tra parentesi dati di altre colture ottenute dalle stesse coppie parentali. In due casi

Tabella 2.

Colture con rapporto sessi anormale.

Coppia P	n.° ♂♂	n.° ♀♀	n.° ♂♂ / n.° ♀♀	chi²	Causa presunta
6	43	23	1,87	6,06	Letale nel cromosona X, in porzione omologa con Y, o caso.
16 ; 38	27	12	2,25	5,76	id. id.
13 ; 58 13 ; 58	2 28	15 43	0,52	8,90	Letale nel cr. X in porzione non omologa con il cr. Y.
13 ; 53 (13 ; 53)	14 (29)	27 (34)	0,52 (0,85)	4,12 (0,40)	Caso
13 ; 70 (13 ; 70)	31 (33)	49 (21)	0,63 (1,57)	4,05 (2,66)	Caso

(13,53 e 13,70) nella seconda coltura il rapporto tra i sessi è normale, perciò le differenze numeriche osservate nella prima sono attribuite al caso; una coppia (13,58) ha dato due colture in cui si osserva notevole deficienza di maschi; il rapporto sessi complessivo è 0,5. Appare quindi altamente probabile che in questo caso la deficienza di maschi sia dovuta ad un letale legato al sesso. Rimangono due colture (6 e 16,38) nelle quali il rapporto sessi è prossimo a due. Mancano per queste elementi di giudizio sussidiari. Un rapporto sessi vicino a due — quando non sia casuale — suggerisce l'esistenza di un fattore letale sul cromosoma X, avente un'omologo normale sul cromosoma Y. Questa ipotesi nei due casi in esame non è convalidata da altri elementi.

Decorso dell'abbattimento nei ceppi parentali e nelle F_1.

Ceppi parentali. Abbiamo visto in occasione della descrizione dei ceppi i risultati di ripetuti controlli; basti qui ricordare l'ambito di tempo in cui si svolse, alle dosi usate, l'abbattimento nei tre ceppi parentali:

	Inizio	Fine
+ *Tripoli*:	15'	30' (1 caso 60')
+ *arancio*:	15'	75'
kdr; plx:	6h	dopo 24h

F_1: Il decorso dell'abbattimento nelle F_1 fu studiato su sei campioni, per complessivi 330 individui; quattro campioni furono ottenuti da incroci con il ceppo + *Tripoli* e due con + *arancio;* furono controllate per ogni incrocio le due combinazioni reciproche. I risultati furono molto omogenei. Infatti la caduta iniziò tra 27' e 33' di contatto e terminò entro 55'; 65'; 65'; 75'; 75'; 80'.

L'abbattimento inizia e termina con ritardo significativo negli eterozigoti rispetto agli omozigoti sensibili. Però la differenza non è tale da permettere una discriminazione (almeno nelle condizioni sperimentali attuate); invece un intervallo di almeno 4 ore intercorre tra il termine della caduta degli eterozigoti e l'inizio della caduta dei resistenti. Perciò è possibile separare con certezza individui che presentino questi due livelli di tolleranza.

Il carattere *kdr* risulta quindi incompletamente recessivo, ma nel presente lavoro sarà considerato come recessivo essendo gli eterozigoti perfettamente discriminabili da una delle due classi di omozigoti.

Decorso dell'abbattimento nelle F_2 inincrociate e reincrociate

Su popolazioni di individui F_2 ottenute da colture di massa (due inincrociate, una reincrociata) fu studiato il decorso dell'abbattimento. Tali popolazioni risultarono includere individui a comportamento analogo a quello delle F_1 e individui a comportamento analogo all'omozigote recessivo. Infatti si ebbe un primo periodo di caduta (ambito nei tre casi: 25' — 75'; 35' — 95';

25'—75': le differenze non sono attribuibili al tipo di incrocio), seguito da un lungo periodo di stasi. In un caso (reincrocio di femmina eterozigote per maschio omozigote recessivo) fu accertato che dopo 10 ore di contatto il secondo periodo di caduta non era ancora iniziato; negli altri due casi l'accertamento fu fatto dopo 2h 30' e 3h 15' di trattamento. Questi controlli confermarono un'arresto di ore nella caduta, e furono considerati sufficienti per dimostrare discontinuità nelle caratteristiche degli individui F_2; questi risultano classificabili in due classi, nelle quali il decorso dello abbattimento corrisponde a quello osservato rispettivamente per gli eterozigoti e per gli omozigoti recessivi. Le frequenze relative di queste due classi discontinue generalmente si accordano, come vedremo particolareggiatamente, con rapporti mendeliani semplici. Gli individui delle due classi sono separabili con certezza dopo 1h 45' di trattamento.

Controllo del riconoscimento delle classi di segregazione nelle F_2.

La discontinuità delle classi e le frequenze in accordo con rapporti mendeliani sono elementi altamente probativi per l'ipotesi che il carattere in esame abbia un controllo genetico monofattoriale. Tuttavia ho voluto eseguire controlli per accertare:

1) se l'appartenere a una delle due classi è un carattere stabile per l'individuo;

2) se la tecnica usata per separare le due classi non dia luogo ad errori e in particolare se con i sensibili cadano accidentalmente anche individui resistenti;

3) se figliate successive di una stessa coppia diano frequenze tra loro omogenee.

Allo scopo di rispondere ai quesiti 1) e 2) ho sottoposto ad un secondo trattamento i sopravvissuti di due F_2 allevate in coltura di massa (una inincrociata: F_2 ♀ + *Tripoli* × ♂ *kdr; plx* ed una reincrociata: (♀♀ F_1 (♀ *kdr; plx* × ♂ + *Tripoli*) × ♂♂ *kdr; plx*)), mantenendo separate le mosche risultate *kdr*-sensibili o resistenti al primo trattamento. Di ognuno dei 4 gruppi così formati (due classi per due F_2) interessava soltanto conoscere se era omogeneo, cioè se non includeva individui pertinenti all'altra classe (evento possibile per errore di classificazione o per il sopravvenire di forti variazioni nella tolleranza individuale). Per questo mi limitai a registrare i limiti dei periodi di caduta. In un caso il numero degli individui trattati non fu esattamente controllato ma fu stimato ad occhio. (Tab. 3).

Le ripetizioni seguirono il primo trattamento a distanza di due giorni per la prima F_2, di 4 per la seconda e confermarono pienamente i risultati precedenti — almeno per la esattezza e la stabilità della classificazione — mentre vi è in un caso un anticipo nell'altro un ritardo nell'inizio del primo periodo di caduta.

Non avendo altre osservazioni non posso discutere queste differenze; mi limito soltanto a rilevare che l'anticipo si è verificato nella F_2 inincrociata ed ha portato l'inizio della caduta a coincidere con quello del ceppo parentale sensibile, mentre in tutte le F_2 inincrociate — e trattate una sola volta — l'inizio dell'abbattimento non coincise mai con quello del ceppo parentale sen-

Tabella 3.

Verifica della esattezza della classificazione e della stabilità del carattere "tempo di abbattimento" in popolazioni F_2.

	I° periodo di caduta (individui sensibili)			II° periodo di caduta (individui resistenti)	
	Inizio	Termine	N. oss.		N. oss.
Inincrocio					
I° Trattamento	35′	1h 35′	678	non iniziato entro 2h 30′	211
II° Tr. (dopo 2 gg.)	10′	1h 30′	530	non iniziato entro 3h 45′ (dopo 18h n. 5 abbattute)	210
Reincrocio					
I° Trattamento	35′	1h 25′	97	non iniziato entro 2h	~ 100
II° Tr. (dopo 4 gg.)	60′	2h	67*	cadute reversibili dopo 3h 30′ (dopo 22h n.16 abbattute)	~ 100

* Due ♀♀ resistono senza mostrare sintomi almeno 5h 45′.

Tabella 4.

Omogeneità delle segregazioni in figliate successive di coppie singole F_1.

Coppia F_1	1° ovodeposizione kdr +	kdr	2° ovodeposizione kdr +	kdr	$Chi^2_{om.}$	$Chi^2_{S.}$
Serie 6						
2.33	36	13	28	10	0,0005	0,09
2.34	29	4	38	9	0.35	3.26
2.35	23	3	33	3	0.18	7.76
Serie 13						
13.52	38	30	26	16	0.18	16.58
13.53	32	5	38	15	1 97	0.37
13.54	23	12	23	19	0.18	9.56
13.57	76	27	42	30	3.93	5.35
13.58	12	3	48	13	0.12	11.70
13.60	15	9	15	16	0.59	12.27

sibile ma coincise con quello della F_1. Questo fatto fu già osservato da altri (10, 9) e da qualche autore fu impugnato per deduzioni di ordine genetico (9). Il non trovare nelle F_2 inincrociate individui sensibili quanto i più sensibili del ceppo parentale, deve, sulla traccia di questo reperto, essere sottoposta a più accurato esame prima di trarne deduzioni circa il determinismo.

I risultati della ripetizione del trattamento sono riepilogati nella Tabella 3; da essa risulta che al secondo controllo su 530 + 67 mosche già classificate sensibili due sole erano resistenti, mentre nessuna su circa 300 resistenti risultò sensibile. Se ne deduce che variazioni nelle condizioni fisiologiche individuali non sono sufficienti per provocare scambi tra le classi (la classe «resistenti» risultò priva di errore) e che la tecnica seguita ammette un errore a carico della classe «sensibili» tanto piccolo da poter essere trascurato.

Le segregazioni in figliate successive di coppie singole (Tab. 4) in 8 casi su 9 esaminati a questo proposito presentano soltanto differenze attribuibili a campionamento casuale, ed anche nel caso anomalo siamo ai margini della significatività ($chi^2_{om} = 3{,}93$). Molte coppie diedero segregazioni che si scostano significativamente dai valori attesi: ($chi^2_s > 3{,}84$): l'omogeneità tra le ovodeposizioni successive di ognuna suggerisce l'esistenza di fattori perturbatori aventi distribuzione familiare e conferma l'attendibilità dei dati raccolti.

Segregazione del carattere *kdr*.

I dati sperimentali e i saggi statistici delle segregazioni osservate sono ostesi nella tabella 5. In questa sono riportati: nella 1ª colonna il numero della serie sperimentale nella 2ª col. la descrizione degli incroci fatti con individui F_1; nella 3ª col. il valore del chi^2 calcolato come saggio di omogeneità tra i sessi nella segregazione del carattere in esame; nelle colonne 4ª, 5ª, 6ª i dati sperimentali ottenuti dall'esame delle F_2; nelle colonne 7ª, 8ª, 9ª è saggiata la ipotesi di monofattorialità e nelle colonne 10ª, 11ª, 12ª è saggiata la omogeneità tra le colture di ogni serie.

Il saggio della omogeneità tra i sessi ha dato in tutti i casi chi^2 molto piccoli: le differenze riscontrate tra i sessi (non riportate) non sono parciò significative in quanto compatibili con differenze casuali. Questo autorizza a non fare distinzioni tra i sessi nei trattamenti ulteriori (*).

L'accordo tra le segregazioni ottenute (col. 5ª, 6ª) e l'atteso nella ipotesi di monofattorialità (col. 7ª) è indicato dai valori dei chi^2_s (col. 8ª). In due casi l'identità tra valore osservato e valore atteso esclude il saggio statistico; in 6 vi è buon accordo tra dati sperimentali e attesi; in 3 vi è disaccordo. Questi corrispondono a due F_2 inincrociate (serie 6, 13) e una reincrociata (serie 11), tutte ottenute da coppie singole. Il saggio della omogeneità tra le

(*) I ♂♂ sono in tutti casi leggermente più sensibili delle ♀♀, ma le differenze non sono tali da interferire con i problemi analizzati nel presente lavoro.

colture di una stessa serie è riportato nelle colonne 10ª, 11ª, 12ª. Esso rivela che nelle serie 6 e 13 (inincroci) che diedero segregazioni in disaccordo con l'ipotesi vi è anche grande eterogenità tra le colture mentre nella serie 11 (reincrocio) lo scostamento del totale rispecchia una condizione realizzatasi in tutte le colture che risultano tra loro omogenee: evidentemente in questa serie ha agito una causa sistematica di errore, mentre nelle altre non vi fu regolarità di comportamento.

Infine in tutte le serie ottenute da coppie singole in cui i valori cumulati si accordano con gli attesi (serie 7, 8, 10, 14) anche i valori parziali risultano tra loro omogenei, convalidando i valori cumulati.

Spingendo al livello delle colture l'esame delle serie in disaccordo con l'ipotesi si possono localizzare le cause dello scostamento del valore cumulato e della eterogeneità tra le colture. (Tab. 6). La serie 6 è formata di 7 colture ottenute da 4 coppie. E' così possibile in tre casi confrontare tra loro due figliate successive della stessa coppia: in tutti i casi vi fu ottimo accordo tra tra le figliate successive (Tab. 4). Inoltre su 4 coppie feconde una (2, 33) diede segregazioni in accordo con l'ipotesi, una (2, 34) si avvicina al limite di significatività con deficienza di omozigoti recessivi, una (2; 35) diede ripetutamente deficienza significativa (tab. 4) ed una (2, 36) assenza di omozigoti recessivi. Si può presumere che talune coppie F_1 fossero portatrici di geni capaci di alterare la frequenza o la penetranza degli omozigoti recessivi.

La serie 11 è formata di 4 colture reincrociate, ottenute da tre coppie ognuna delle quali diede una deficienza — di per se non significativa — di omozigoti recessivi, che, cumulandosi, raggiunge la significatività a livello del totale: è ovvio che in questo casi agì sistematicamente una causa di errore non individuata.

Nella serie 13, inincrociata come la serie 6 ma derivata dal ceppo + *arancio*, troviamo tre coppie con due duplicazioni che danno risultati omogenei e in accordo con l'ipotesi (13, 53; 13, 55; 13, 58) mentre 5 coppie, di cui 4 controllate con due duplicazioni, danno risultati tra loro omogenei ma in disaccordo con l'ipotesi per eccesso di recessivi (13, 52; 13, 54; 13, 57; 13, 59; 13, 60).

Riepilogando possiamo delineare il complesso dei risultati sperimentali dicendo che:

1) Tutte le F_2 ottenute da colture di massa, sia con inincrocio (serie fs, 5, 12) sia con reincrocio (serie 9) diedero segregazioni in accordo con rapporti mendeliani semplici;

2) le serie di colture F_2 ottenute con inincrocio da coppie singole F_1 inclusero, accanto a colture con segregazioni regolari, colture con segregazioni affette da errore;

3) le deviazioni dall'atteso furono dello stesso segno, cioè le irregolarità furono dello stesso tipo, in tutte le colture anormali di una stessa serie, e in

TABELLA 5.

Segregazione di Kdr.

Serie sperimentale	Descrizione degli incroci	Dati sperimentali					Fertilità	Normalità del rapporto sessi (Ipotesi n° ♂♂ : n° ♀♀ = 1:1)				
		n° coppie	n° colture	♂♂	♀♀	tot.	$\bar{n} \pm s_{\bar{x}}$	χ^2_s	$\chi^2_{int.}$	g.l.	P	n° colt. anomale
1	♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr;plx*	5	5	110	102	212	42,40 ± 18,27	0,30	9,26	4	0,05	1
2	♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*	2	2	49	51	100	50,00 ± 12,00	0,04	0,04	1	0,85	0
3	♀ + *arancio* X ♂ *kdr;plx*	1	2	76	68	144	72,00 ± 8,00	0,44	0,8	1	0,60	0
4	♀ *kdr;plx* X ♂ + *arancio*	2	2	12	13	25	12,50 ± 3,50	0,04	0,31	1	0,61	0
5	♀♀ X ♂♂ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr;plx*)	massa	(2)	183	182	365	— —	0,003	0,0003	1	0,99	—
6	♀ X ♂ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr;plx*)	4	7	135	130	265	37,85 ± 3,00	0,94	9,46	6	0,14	0
7	♀ X ♂ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*)	5	7	101	68	169	24,14 ± 3,79	6,44	4,54	6	0,60	1
8	♀ F_1 (♀ + *Tripoli* X ♂ *kdr;plx*) X ♂ *kdr;plx*	2	2	32	38	70	35,00 ± 5,00	0,51	3,22	1	0,80	0
9	♀♀ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*) X ♂♂ *kdr;plx*	massa	(1)	129	103	232	— —	2,91	—	—	—	—
10	♀ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*) X ♂ *kdr;plx*	2	3	54	50	104	34,66 ± 7,45	1,53	0,23	2	0,90	0
11	♀ *kdr;plx* X ♂ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *Tripoli*)	3	4	41	54	95	23,75 ± 2,92	0,51	1,14	3	0,75	0
12	♀♀ X ♂♂ F_1 (♀ *kdr;plx* X ♂ + *arancio*)	massa	(1)	17	19	36	— —	1,11	—	—	—	—
13	♀ X ♂ F_1 (♀ + *arancio* X ♂ *kdr;plx*)	9	14	351	436	787	56,21 ± 6,47	9,18	17,46	13	0,15	3
14	♀ F_1 (♀ + *arancio* X ♂ *kdr;plx*) X ♂ *kdr;plx*	4	6	160	166	326	54,33 ± 6,08	0,11	7,02	5	0,20	1
	Totali	39	54 + (4)	1450	1480	2930						

particolare lo furono per difetto di omozigoti recessivi nella serie 6, per eccesso nella 13;

4) una serie di F_2 reincrociate mostrò uno scostamento sistematico dai valori attesi;

TABELLA 6.

Segregazioni non in accordo con rapporti mendeliani semplici. Dati parziali (colture).

Coppia F_1	n.° colt.	*kdr* +	*kdr*	totale	chi²	chi^2_S	$chi^2_{int.}$
2.23	2	64	23	87	0.09		
2.34	2	67	13	80	3.26		
2.35	2	56	6	62	(7.76)*		
2.36	1	36	0	36	18.62**		
Serie 6. .	7	223	42	265	21.97	11.83	10.14
16.8	2	31	19	50	2.89		
16.9	1	14	6	20	3 20		
16.10	1	16	9	25	1.90		
Serie 11. .	4	61	34	95	7.99	7.67	0.32
13.52	2	64	46	110	16.58		
13.54	2	46	31	77	9.56		
13 57	2	118	57	175	5.35		
13.59	1	15	16	31	11.70		
13.60	2	30	25	55	12.27		
	9	273	175	448	55.56	47.25	8.31
13.53	2	70	20	90	0 37		
13.55	1	68	24	92	0.58		
13.58	2	60	16	76	0.63		
	5	198	60	258	1.48	0.41	1.07
Serie 13 . .	14	471	235	706	57.04	25.85	31.19

* Valore non utilizzato nel calcolo di $chi^2_{tot.}$

** Valore del chi² calcolato cumulando i dati della colt. 2,35 e quelli della colt. 2,36.

5) eterogeneità tra le colture fu osservata in tutte le serie formate con individui tra loro fratelli (e soltanto in esse).

Ne possiamo dedurre che in singole famiglie F_2, ottenute per inincrocio di coppie, possono verificarsi interferenze di natura genetica nella regolare ricomparsa di omozigoti recessivi. Gli elementi a disposizione non permettono di stabilire se ciò sia dovuto a perdita di zigoti o a fenomeni di natura feno-

tipica. La regolarità osservata nelle colture di massa può essere attribuita al più completo rimescolamento del patrimonio genetico assicurato dalle libere possibilità di accoppiamento (*) e a compensazioni di errori.

Rapporti tra la resistenza all'abbattimento e la sopravvivenza.

I rapporti tra resistenza all'abbattimento e sopravvivenza non possono essere analizzati su tutte le serie precedentemente considerate. Infatti la serie *fs*, non fu studiata sotto questo aspetto e la serie 9 deve essere trattata a parte perchè gli individui *kdr* rimasero a contatto con l'insetticida per 24 ore

Tabella 7.

Abbattimento e mortalità. Dati cumulati.

Fenotipo	*kdr* + (sensibili all'abbattimento)				*kdr* (resistenti all'abbattimento)			
Esito	soprav-vissuti	morti	totale	% morti	soprav-vissuti	morti	totale	% morti
♂♂	159	558	717	77,82	313	7	320	2,19
♀♀	335	387	722	53,60	359	1	360	0,27
totale	494	945	1439	63,10	676	8	680	1,17

Per l'assenza di interazione tra sesso e esito nella classe *kdr* + : $chi^2 = 92,82$.

anzichè due. Rimangono 9 serie i cui dati cumulati possono dare un primo orientamento. Questi sono presentati classificati secondo 3 criteri (tempo di abbattimento, mortalità, sesso) nella tabella 7.

La mortalità complessiva risulta profondamente diversa nelle due classi *kdr* + (sensibili all'abbattimento) e *kdr* (resistenti all'abbattimento). Nella prima raggiunge il 63%, nella seconda è di circa 1%. Questi valori sono basati su parecchie centinaia di individui e la differenza è tale da non richiedere l'uso di saggi statistici per accertarne la significatività.

Ne risulta che l'essere sensibili all'azione abbattente non esclude la possibilità di sopravvivere, mentre alla resistenza allo abbattimento si accompagna sempre anche capacità di sopravvivenza.

In altri termini possiamo dire che gli individui omozigoti per il gene *kdr* sono risultati in grado di sopravvivere al trattamento; essi hanno presentato associate le due manifestazioni di resistenza (*tipo b*); invece una parte note-

(*) E' accertato che sono possibili copule in successione anche a brevi intervalli; non è però noto se ciò comporti stratificazione o mescolanza degli spermi di origine diversa.

vole (37%) degli individui sensibili, portatori dell'allele dominante *kdr* +, sono risultati sensibili soltanto all'abbattimento (*tipo a*).

Circa gli individui *kdr* omozigoti, basti aggiungere che la mortalità fu leggermente più elevata tra i maschi, e che dei 7 maschi morti, 6 furono trovati in due colture (4 su 10 e 2 su 2 ♂♂ *kdr* rispettivamente). La mortalità quindi tra gli individui *kdr*, oltre ad essere tanto bassa da potere essere trascurata, è concentrata in due colture su 43; è presumibile che fattori occasionali ne siano responsabili.

La mortalità nella classe « sensibili » (portatori di almeno un gene *kdr* +) merita un più approfondito esame. Possiamo raggruppare i dati secondo tre criteri: ceppo parentale normale; tipo d'incrocio; sesso. I dati sono presentati nella tab. 8 in cui, oltre ai dati sperimentali, sono indicati la incidenza percentuale della mortalità nelle varie categorie ed i chi^2 calcolati come saggio delle seguenti ipotesi:

1) Esistenza di differenze nella capacità di sopravvivenza in individui *kdr* + (sensibili all'abbattimento) attribuibili al ceppo normale parentale (confronto tra le colonne). Questi saggi sono disposti nell'ultima colonna a destra.

2) Esistenza di differenze attribuibili al tipo di incrocio (inincrocio o reincrocio, corrispondenti ad un contributo genico da parte del ceppo *kdr; plx* di 1/2 e 3/4 rispettivamente). Questi saggi sono disposti sulla terza e sesta riga.

3) Esistenza di differenze attribuibili al sesso. Sono riportati soltanto i saggi di significatività disposti sulle righe 7 e 8. Essi si riferiscono ai dati sperimentali disposti sulle righe 1 e 3, 2 e 4 rispettivamente.

Dall'esame della tabella risulta:

1) il ceppo normale parentale influisce sulla incidenza della mortalità (chi^2 maggiore di 3,84 in tre casi su 4). Le serie in cui il ceppo parentale fu + *Tripoli* diedero forte discrepanza tra i sessi ed i valori di mortalità più bassi (femmine) e più elevati (maschi) riscontrati nel gruppo di esperimenti.

2) La mortalità è significativamente più elevata negli inincroci che nei reincroci ad eccezione dei maschi derivati dall'incrocio con il ceppo + *Tripoli*.

3) La mortalità è significativamente diversa tra i sessi nell'incrocio con + *Tripoli;* non lo è negli incroci con + *arancio.*

Ne possiamo dedurre che: *a*) i patrimoni genetici dei ceppi + *Tripoli* e + *arancio* differiscono tra loro nel contenuto in geni conferenti capacità di sopravvivenza; *b*) il ceppo *kdr; plx* è apportatore di fattori favorevoli: appare probabile, dato che il ceppo *kdr; plx* non fu selezionato per la DDT resistenza, che il gene *kdr* anche allo stato eterozigote possa conferire grande capacità di recupero; *c*) almeno una parte dei geni favorevoli pare legata o limitata al sesso e contribuisce a stabilire differenze tra i ceppi + *Tripoli* e + *arancio*. L'incidenza della mortalità tra i portatori di *kdr* + segregati dagli incroci con il ceppo + *arancio* ha, nei dati cumulati qui riportati, fre-

quenze percentuali che si avvicinano a rapporti mendeliani semplici (67,42 e 73, 50 tendono a 75%; 41,09 e 48,68 tendono a 50%). Tuttavia la ipotesi della esistenza di un gene recessivo autosomico indipendente da *kdr* capace di conferire attitudine alla sopravvivenza non viene considerata perchè i dati parziali (delle colture, non riportati) sono altamente eterogenei.

Negli incroci con il ceppo + *Tripoli*, nei maschi si ha quasi completa coincidenza tra abbattimento e morte; invece la mortalità è assai bassa tra le

TABELLA 8.

Mortalità tra gli individui kdr+ *segregati nelle* F_2.

Ceppo P		+ Tripoli			+ arancio			Omogeneità tra le F_2 ottenute da ceppi + P diversi. chi²
Sesso	Tipo di incrocio	n.° osservati	n.° morti	% morti	n.° osservati	n.° morti	% morti	
♀♀	Inincrocio	301	151	50,16	264	178	67,42	19,50
	Reincrocio	84	28	33,33	73	30	41,09	0,40
Omogeneità tra i due tipi di incrocio: chi²		6,83			15,05			
♂♂	Inincrocio	341	289	84,90	234	172	73,50	10,7
	Reincrocio	66	60	90,90	76	37	48,68	27,13
Omogeneità tra i due tipi di incrocio: chi²		1,25			15,00			
Omogeneità tra i sessi; chi².								
	Inincrocio	113,00			1,98			
	Reincrocio	48,00			0,58			

femmine, e diminuisce con l'aumentare del contributo genico del ceppo *kdr; plx* (minore nei reincroci). Questi sono sicuri indizi di una situazione genetica complessa che richiede per essere chiarita dati sperimentali che attualmente mancano poichè dal piano di raccolta dei dati fu esclusa l'analisi del comportamento ereditario della resistenza alla mortalità.

A proposito della mortalità aggiungerò soltanto che su 43 colture F ottenute da coppie singole, in 8 si verificò perfetta concidenza tra sensibilità all'abbattimento e mortalità; qualora si considerino solo i maschi tale coincidenza è riscontrabile in 27 colture, cioè in più del 60% delle colture esaminate.

Queste colture sono distribuite in tutte le serie sperimentali ad eccezione della serie 14 in cui in nessuna coltura vi fu mortalità totale tra gli individui *kdr* +. Ricordando quanto già abbiamo visto a proposito della resistenza dell'abbattimento — che ha coinciso sempre con capacità di sopravvivenza — ne consegue che una parte non trascurabile dei dati qui riportati, notevolmente diversa a seconda del metodo di esame (8 oppure 27 su 43 a seconda che si considerino i due sessi o i soli maschi) ha dato segregazioni che si accorderebbero con l'ipotesi che un singolo gene sia responsabile della DDT resistenza intesa come capacità di sopravvivenza (18).

Ereditarietà del carattere *plexus* (*plx*).

Il carattere *plexus* (*plx*), come abbiamo visto, può essere intensificato con la selezione; questo indica l'esistenza di geni con azione ausiliaria. Il comportamento ereditario fu diverso a seconda del ceppo normale usato, e nei due casi vi furono differenze nei rapporti di segregazione (Tab. 9).

Negli incroci con il ceppo + *Tripoli*, le F_1 diedero tutti individui normali (♀♀ e ♂♂). I mutanti segregati nelle F_2 e nei reincroci ebbero espressività molto variabile; solo per i maschi le proporzioni appaiono in accordo con l'ipotesi di monofattorialità; le ♀♀ diedero in tutti i casi un notevole eccesso di mutanti, in proporzioni non chiaramente riconducibili a rapporti mendeliani modificati.

Tabella 9.

Segregazione del carattere plexus.

Ceppo *plx* + parentale	Tipo di incrocio	Serie	♀♀			♂♂		
			plx +	*plx*	totale	*plx* +	*plx*	totale
+ Tripoli	Inincrocio	5	71	111	182	128	55	183
		6	54	76	130	99	36	135
		7	33	35	68	69	32	101
	Reincrocio	8	2	36	38	6	26	32
		9	15	88	103	51	78	129
		10	11	39	50	43	11	54
		11	5	49	54	20	21	41
+ arancio	Inincrocio	12	7	10	17	16	3	19
		13	66	370	436	198	153	351
	Reincrocio	14	18	148	166	68	92	160

Negli incroci con il ceppo + *arancio* (di origine remota comune al ceppo *plx*) le F_2 furono costituite da ♀♀ mutanti (espressività molto bassa) e ♂♂ normali. Nelle F_2, anche considerando il carattere come dominante nelle ♀♀ e recessivo nei ♂♂ vi fu in tutti i casi e nei due sessi un eccesso di mutanti. Tuttavia nell'unico reincrocio fatto, i ♂♂ mutanti, pur in eccesso, furono in proporzione compatibile con l'ipotesi di monofattorialità.

Se ne deduce che i genotipi dei due ceppi normali saggiati differiscono nel contenuto in geni ad azione ausiliaria al gene *plx*, e che presumibilmente almeno uno di questi, forse un modificatore della dominanza, è legato al sesso, ed è presente nei due ceppi di origine comune (*plx* e + *arancio*). I dati raccolti non permettono però una analisi esauriente limitandosi a due generazioni.

Rapporti tra i caratteri *plexus* e *knockdown-resistance*.

Il carattere *plexus* in *Musca domestica* L. non ha un comportamento ereditario semplice; tuttavia una parte dei dati di segregazione suggerisce l'esistenza di un gene avente azione direttiva nel suo determinismo.

Questo carattere può essere osservato attualmente manifesto in mosche raccolte in natura o quale segregante in seguito ad inincroci nei campionamenti di popolazioni naturali. Le mie osservazioni si limitano a popolazioni che hanno colonizzato regioni estensivamente trattate con DDT.

Questo mutante fu già osservato da G. Bodenstein (1) precedentemente alla introduzione del DDT nell'uso comune e fu interpretato come mutazione indotta da irradiazioni con raggi Roentgen. Questo suggerisce che se preesisteva al trattamento con raggi X, doveva essere molto raro nella popolazione studiata da questo autore.

Un processo di selezione mirante ad aumentare la espressività fu accompagnato da raggiungimento di grande tolleranza al DDT (determinata da un singolo gene recessivo autosomico (presente ricerca)).

Inoltre è noto un caso inverso, verificatosi durante un esperimento di selezione con un insetticida fosforato. Snyder (24) infatti osservò in un ceppo selezionato per resistenza al parathion (DFP strain) una percentuale molto elevata di individui mostranti anormalità nelle venature alari («little stubs coming off the fourth vein and so on»). I fenotipi indicati sono osservabili in *plexus* con cui il mutante di Snyder sembra identificabile.

Questo complesso di osservazioni suggerisce che il carattere *plexus* possa essere associato a fattori favorevoli in condizioni particolari.

I dati da me raccolti sulla ereditarietà del carattere *plexus* non hanno permesso di chiarirne il determinismo genetico; la mortalità non è stata analizzata in termini di carattere ereditario ma è stata considerata come un epifenomeno nella segregazione di una caratteristica fisiologica riconoscibile perchè ritarda la comparsa di sintomi nelle intossicazioni da DDT. Perciò l'in-

dagine sui rapporti tra presenza del carattere morfologico e attitudine alla sopravvivenza non può essere esauriente.

I dati sperimentali sono presentati nella tabella 10. Possiamo raggruppare le frequenze assolute e relative degli individui *plx* + in funzione del ceppo normale parentale, del tipo di incrocio, del sesso e dell'esito del trattamento. Oltre ai totali riferiti ai tipo di incrocio — saggiati statisticamente — sono riportati i dati delle singole serie. I risultati possono essere così riepilogati:

1) Presenza di interazione fra fenotipo ed esito della intossicazione è stata riscontrata soltanto nelle F_2 derivate dagli incroci con il ceppo + *Tripoli* ($chi^2 > 3{,}86$): la frequenza di individui *plx* + (normali) è maggiore tra gli individui morti.

2) e 3) Presenza di interazione è stata riscontrata sia negli inincroci, in ambo i sessi, sia nei reincroci, limitatamente alle femmine.

TABELLA 10.

Presenza di interazione tra fenotipo e esito della intossicazione.

Ceppo *plx* +	Tipo di incrocio	Serie	♀♀ sopravvissute n.° *plx* +	♀♀ sopravvissute °/o *plx* +	♀♀ morte n.° *plx* +	♀♀ morte °/o *plx* +	chi²	♂♂ sopravvissuti n.° *plx* +	♂♂ sopravvissuti % *plx* +	♂♂ morti n.° *plx* +	♂♂ morti % *plx* +	chi²
+ *Tripoli*	Inincrocio	5	54	36,48	17	50,00		54	62,79	74	76,29	
		6	17	32,69	37	47,43		13	76,47	86	72,88	
		7	14	48,27	19	48,71		11	44,00	58	76,31	
		totale	85	37,12	73	48,34	4,29	78	60,94	218	74,91	7,71
+ *Tripoli*	Reincrocio	8	1	(2.70)	1	(—)		2	11,11	4	28,57	
		9	14	14,28	1	(20)		29	38,66	22	40,74	
		10	5	14,28	6	40,00		22	75,86	21	84,00	
		11	4	9,52	1	8,33		7	35,00	13	61,90	
		tota'e	24	11,[illegible]2	9	27,88	4,94	60	42,25	60	52,62	2,23
+ *arancio*	Inincrocio	12	4	36,36	3	50,00		8	80,00	8	88,88	
		13	33	15,42	23	13,37		86	57,72	93	55,68	
		totale	37	16,44	26	14,60	0,13	94	59,11	101	57,38	0,06
+ *arancio*	Reincrocio	14	10	7,87	4	13,33	1,13	45	37,81	21	56,75	3,41

4) Su 14 dati parziali (7 serie sperimentali, 2 sessi) che contribuiscono alle osservazioni riferite ai n. 1) e 2), in 11 è stata osservata eccedenza di individui *plx* + tra i morti.

Ne possiamo concludere con notevole margine di sicurezza che tra gli individui provenienti dagli incroci con il ceppo + *Tripoli* l'essere fenotipicamente normale oppure *plx* è accompagnato da una maggiore o minore probabilità di soccombere al contatto con il DDT, almeno nelle condizioni realizzante in questo gruppo di esperimenti.

Riepilogo.

Questo gruppo di esperimenti ha permesso:

di confermare che il tempo di insorgenza dei sintomi di intossicazione da DDT in *Musca domestica* è un carattere discontinuo, controllato da una singola coppia allelica;

tuttavia le segregazioni possono, per interferenza di altri fattori ereditari, non corrispondere ai rapporti mendeliani attesi, specialmente negli inincroci;

la resistenza all'abbattimento è sempre associata a capacità di sopravvivenza ma anche nelle segregazioni mendeliane si verifica quanto era già noto per alcuni ceppi: la rapida comparsa di violenti sintomi di intossicazione non comporta necessariamente un esito letale.

in una parte dei dati sperimentali, non trascurabile e diversa a seconda che si considerino i due sessi o i soli maschi, vi fu completa coincidenza anche tra abbattimento precoce e morte, oltre che tra abbattimento ritardato e sopravvivenza. Questo spiega come mai lo studio della mortalità possa talora indicare, sia pure confusamente, l'azione di un gene principale;

è stato dimostrato che i risultati degli incroci pur rimanendo sempre interpretabili in base all'ipotesi della monofattorialità, possono presentare differenze dipendenti dal ceppo normale usato;

l'importanza del ceppo normale sui risultati finali fu verificata anche nell'ereditarietà del carattere morfologico *plexus* (geneticamente complesso) e nella parziale associazione di questo carattere con l'attitudine alla sopravvivenza;

la mancanza di completa transvariazione tra i tempi di caduta nelle segregazioni delle F_2 e nei ceppi sensibili, generalmente osservata, non fu riscontrata quando i sopravvissuti ad un primo trattamento furono nuovamente esposti, dopo due giorni, al contatto con il DDT. Se questo risultato fosse ripetibile, un elemento nuovo dovrebbe essere introdotto per una esauriente interpretazione dei reperti.

Discussione.

Il disaccordo tra gli autori che si sono occupati della ereditarietà della DDT-resistenza comprende i seguenti punti:

1) definizione del carattere in esame e modalità di trasmissione ereditaria;

2) controllo genetico del carattere *knock-down resistance*;

3) rapporti di dominanza tra i caratteri alternativi « resistenza e sensibilità all'abbattimento ».

Sintomatologia ed esito, conseguenze della introduzione di DDT nell'organismo che compaiono in successione, furono considerati nelle prime ricerche due aspetti della intossicazione (10, 14) collegati tra loro da un rapporto biunivoco, ma la possibilità di separarli venne ben presto riconosciuta sia in termini genetici, sia in termini fisiologici (11, 12, 4, 5). Per questo sono stati coniati i due termini *knock-down resistance* e *kill-resistance*. Tuttavia in un lavoro molto recente (9) la caduta in supinazione viene ancora interpretata come prova di morte futura, e con questa identificata nella presentazione dei dati. Essendo inequivocabilmente provato (2, 4, 5, 12, 18, presente lavoro) che tale identificazione non è legittima, ne consegue che le conclusioni tratte da osservazioni sulla supinazione debbono essere considerate un contributo allo studio della ereditarietà dello abbattimento e non della sopravvivenza.

La resistenza all'abbattimento è risultata (questo lavoro) una proprietà accompagnata sempre da capacità di sopravvivenza. Ne consegue che selezione per il primo carattere (*kdr*) porta a ceppi omogenei resistenti all'abbattimento e anche in grado di sopravvivere a forti dosi. Invece la capacità di sopravvivenza è compatibile anche con sensibilità alla azione abbattente: la selezione per la sopravvivenza può portare alla formazione di ceppi eterogenei, almeno per il carattere *kdr*. Tuttavia la presenza di questo gene appare molto probabile nei ceppi altamente resistenti selezionati in funzione della sopravvivenza dato che sono descritti come resistenti anche all'abbattimento (2); da quest'ultima considerazione consegue che da esperimenti in cui sia stata studiata l'ereditarietà della sopravvivenza dovrebbe trapelare l'esistenza nel ceppo resistente di un gene recessivo capace, allo stato omozigote, di assicurare tolleranza di forti dosi.

Tra le ricerche a me note (2, 16, 12) nessuna analizza l'ipotesi della multifattorialità attribuita al carattere « resistenza » inteso come capacità di sopravvivenza. Tale ipotesi tuttavia è proposta soprattutto per giustificare erraticità di reperti e mancanza di rapporti mendeliani nelle segregazioni.

Può essere interessante vedere se i dati di Bruce e Decker (in base ai quali fu emessa l'ipotesi che la resistenza — intesa appunto come capacità di sopravvivenza — sia un carattere poligenico) siano compatibili con altra ipotesi.

Gli elementi portati a sostegno alla ipotesi di poligenia sono: 1) la F_1 ha caratteristiche intermedie ai due ceppi parentali; 2) l'eterogeneità riscontrata nella F_1 permane immutata fino alla F_{15}.

L'attributo intermedio (intermediate LD50) non è dovuto soltanto alla comparsa in questa generazione di individui aventi tolleranza intermedia ma soprattutto alla presenza di individui transvarianti con le tolleranze dei due ceppi usati nell'incrocio. Essendo questi profondamente diversi, la eterogeneità della F_1 risulta assai grande e maggiore che nei ceppi di origine: infatti include quasi tutto l'ambito di variabilità di quello *resistente* e si estende fino a raggiungere i plus-varianti del *sensibile*.

Quando una F_1 include fenotipi caratteristici dei due ceppi parentali è legittima l'ipotesi che almeno uno di questi non sia geneticamente omogeneo. Nel caso in esame la descrizione dei dati suggerisce come ammissibile l'ipotesi che il carattere « sensibilità » sia incompletamente dominante (corrispondenza fenotipica limitata ai plus-varianti del ceppo parentale sensibile con i minus-varianti della prima generazione incrociata); b) che l'incrocio ammetta formazione di omozigoti recessivi (individui resistenti), cioè che il ceppo *sensibile* fosse geneticamente impuro.

Il permanere dello stesso grado di eterogeneità nelle generazioni successive alla prima non si oppone alla ipotesi di monofattorialità essendo previsto quando i caratteri segreganti siano selettivamente indifferenti. La corrispondenza nella eterogenità delle due prime generazioni (F_1 e F_2) potrebbe indicare soltanto che la comparsa di omozigoti recessivi nella F_1 aveva già portato la popolazione in prossimità di quell'equilibrio nella distribuzione degli alleli recessivi che solitamente è raggiunto nelle F_2.

Gli autori che hanno scelto il tempo di abbattimento come criterio discriminante (10, 14, 18, questo lavoro) concordano nel ritenere dimostrato o molto probabile che il carattere osservato sia monofattoriale.

Come abbiamo già visto a questo tipo di ricerche si deve aggiungere per la metodologia seguita anche quella di D'Alessandro e Mariani (8, 9) di particolare interesse in una rassegna critica perchè gli autori interpretano i loro reperti come prova che il carattere considerato è poligenico.

In primo luogo occorre accertare se le definizioni « supinazione irreversibile » usata da D'Alessandro e Mariani e « caduta o abbattimento » si riferiscano allo stesso stato di intossicazione. Le definizioni verbali appaiono perfettamente corrispondenti: « caduta definitiva dell'insetto... (supinazione) » secondo D'Alessandro e Mariani (9) e « permanent loss of equilibrium » secondo Jaeger e Munson (13) che primi definirono il « knock-down ».

Inoltre è possibile un confronto tra i dati sperimentali dato che i trattamenti furono fatti con dosi di efficacia vicina. Nel ceppo *sensibile* di D'Alessandro e Mariani la supinazione è totale entro 30' come la caduta del mio ceppo + *Tripoli;* nelle F_1 la caduta si svolse entro 1h 30' negli esperi-

menti di D'ALESSANDRO e MARIANI; entro un tempo massimo di 1h 20' nei miei. Essendo le dosi ed i tempi di caduta corrispondenti, ne consegue che abbattimento e supinazione sono due locuzioni che indicano lo stesso stadio di intossicazione e sono quindi sinonimi.

D'ALESSANDRO e MARIANI non pubblicano i dati osservati nei conteggi ma percentuali; per le F_2 non è indicato il numero di osservazioni da cui sono ricavate. Tuttavia l'esame di un grafico (I°) in cui è rappresentata « la curva integrale della mortalità (= *supinazione, n. R. M.*) media nel tempo » rivela che nelle F_2 questo carattere è rappresentato da una spezzata con due flessi di cui il secondo comporta una deviazione angolare molto forte, tanto da imporre alla curva un'andamento pressochè parallelo all'asse delle ascisse (tempi). Questo denota forte discontinuità nella distribuzione nei vari livelli di tolleranza all'interno delle popolazioni F_2, le quali risultano chiaramente separabili in due gruppi di individui a seconda che cadano o no entro 1h 30' di contatto. Se il carattere « tempo di caduta » fosse poligenico la F_2 sarebbe caratterizzata da continuità nelle proprietà degli individui. Lo stillicidio di cadute che avviene tra 1h 30' e 10h 30' e forma la classe « medio resistenti » impedisce una separazione netta in funzione del tempo di caduta; tuttavia è evidente che l'intossicazione decorre con leggi diverse nei due periodi.

Osservazioni non pubblicate su ceppi di laboratorio e su popolazioni naturali (MILANI, FILIPPONI) hanno permesso di riconoscere che le popolazioni eterogenee per il carattere *kdr* possono essere separate in due classi o nettamente distinte (come nelle segregazioni da me osservate) o collegate da individui intermedi (relativamente pochi) come nel caso di D'ALESSANDRO e MARIANI. E' chiaro che tali differenze di comportamento rispecchiano differenze di natura genetica, che limitano le possibilità di una chiara discriminazione.

Gli argomenti per cui D'ALESSANDRO e MARIANI rigettano l'ipotesi che il carattere da loro preso in esame abbia un controllo monogenico sono:

1) mancanza di completa dominanza in F_1; 2) non corrispondenza delle segregazioni osservate con rapporti mendeliani attesi; 3) comparsa di individui sensibili e resistenti nelle F_3 quando le coppie F_2 siano formate con individui resistenti oppure sensibili; 4) mancanza di individui sensibili quanto i più sensibili del ceppo parentale nelle F_2.

A parte il fatto che il grado di dominanza (completa o incompleta) attribuito ad un allele dipende generalmente dal livello cui l'indagine è spinta, (e comunque l'ereditarietà intermedia non è proprietà esclusiva dei poligeni) il non trovare corrispondenza tra valori osservati ed attesi nelle segregazioni non è elemento sufficiente per stabilire le modalità di controllo genetico del carattere; abbiamo visto come proprio per questo in esame le segregazioni possono essere disturbate; l'esistenza di interferenze di natura genetica con la segregazione di un carattere non indica necessariamente polimeria o poligenia:

in questi casi infatti si deve verificare integrazione o additività degli effetti genici.

Infine la ricomparsa di individui resistenti (carattere recessivo) da coppie formate con individui sensibili non stupisce dato che omozigoti dominanti ed eterozigoti possono avere soglie di tolleranza eguali. Assai più importante appare il reperto di coppie di individui F_2 resistenti (presunti recessivi omozigoti) capaci di generare anche individui sensibili. Tuttavia la descrizione dell'esperimento autorizza a credere che accoppiamenti incontrollati possano avere preceduto la formazione delle coppie («le superstiti... dopo 24 ore di permanenza nella gabbia al DDT furono prelevate ed allevate, ottenendosi ovodeposizioni, larve e adulti») (9). Qualora questa possibilità risultasse esclusa, rimarrebbe da vagliare l'ipotesi che genotipo e fenotipo possano non essere in corrispondenza biunivoca, cioè considerare, contrariamente all'opinione degli autori, la possibilità che variazioni di espressività possano essere tanto forti da portare a penetranza incompleta (20).

Naturalmente, mancando gli elementi obiettivi (valori osservati) non è possibile stimare le probabilità di errore delle varie ipotesi.

Rimane da esaminare la diversa valutazione della dominanza del gene *kdr*, giudicata incompleta da HARRISON, KEIDING, MILANI e completa da KIRK e MAELTZER. Questi ultimi autori usarono nelle prove per contatto tarsale 10 mg/sq. foot, cioè approssimativamente 0,10 gr./mq.: tale dose è uguale a circa 1/10 di quella da me usata. Appare assai verosimile che le differenze di risultato possano non rispecchiare differenze obbiettive nella tolleranza degli eterozigoti: avendo questi proprietà diverse dai due fenotipi parentali è possibile che appaiano più simili agli uni o agli altri a seconda del livello cui viene spinta l'analisi.

Il fatto che transvariazione tra le curve di abbattimento degli omozigoti sensibili e degli eterozigoti sia presente soltanto alla dose maggiore può indicare che i due genotipi in esame reagiscono in modo diverso ad uguali variazioni delle dosi.

Le osservazioni di tutti gli autori portano concordemente alla constatazione che nelle F_2 non compaiono individui sensibili quanto i minus-varianti del ceppo parentale. Soltanto D'ALESSANDRO e MARIANI hanno cercato di interpretare questo fatto assumendolo a prova di poligenia del carattere. Potrebbe però trattarsi di una variazione della specificità o della espressività del carattere conseguente all'aumento di eterogeneità nel genotipo residuo come avviene, per citare un solo esempio, nella ereditarietà della pezzatura del mantello in tutti i mammiferi su cui tale carattere sia studiabile; tuttavia, come abbiamo visto, questo fatto richiede un più approfondito esame.

Il disaccordo tra gli autori che si sono occupati della ereditarietà della DDT-resistenza appare dovuto assai più a questioni formali che a fenomeni obbiettivi. L'esistenza di un gene capace, allo stato omozigote, di conferire

grande ritardo nella comparsa dei sintomi d'intossicazione (ritardo accompagnato sempre da capacità di sopravvivenza), appare incontrovertibilmente provato; tuttavia le caratteristiche genotipiche della specie in oggetto e le scarse conoscenze genetiche su di essa possono rendere di difficile interpretazione i risultati degli incroci.

La distinzione tra kill-resistance e knock-dwn-resistance ha indubbiamente molte giustificazioni sperimentali oltre ad una notevole utilità pratica: tuttavia, benchè accettabile, non risulta ancora esaurientemente analizzata nè in termini fisiologici nè in termini genetici. La difficoltà maggiore allo stato attuale delle conoscenze, si incontra nello studio della capacità di sopravvivenza. In questo caso differenze individuali dovute a proprietà presumibilmente di natura biochimica si debbono studiare non in termini di «capacità di reazione» ma di «sopravvive o muore». Mentre il susseguirsi dei sintomi, e quindi lo studio dell'abbattimento, permette di seguire sia pure indirettamente, dei fenomeni che avvengono all'interno dell'individuo e di formulare confronti in termini alternativi o quantitativi, l'esito (anche se espresso dalle frequenze di morti o sopravvissuti — legate da una certa legge alle dosi) è sempre accertato in base a due condizioni che, pur escludendosi a vicenda (vita o morte), non implicano necessariamente possesso di proprietà fisiologiche alternative o quantitativamente diverse negli individui trovati nell'una o nell'altra condizione, nè tanto meno implicano eguaglianza di caratteristiche tra gli individui per i quali l'esito sia stato uguale. Ne conseguono difficoltà nella preparazione del materiale necessario alle ricerche e nel riconoscimento delle caratteristiche individuali. Queste difficoltà inevitabilmente si riflettono sui reperti sperimentali rendendone ambigua l'interpretazione.

RINGRAZIAMENTO.

Il presente lavoro rientra nel piano di ricerche sulla mosca domestica concordato tra la Rockefeller Foundation e l'Istituto Superiore di Sanità. E' mio gradito dovere ringraziare il Prof. DOMENICO MAROTTA, Direttore Generale di questo Istituto, e il Dott. E. MOSNA, Capo del Laboratorio di Parassitologia, per l'ospitalità offertami e le innumerevoli facilitazioni datemi per la realizzazione del lavoro. Ringrazio pure i Sigg. E. PIERDOMINICI e A. M. PROIETTI per la assidua assistenza prestatami nella esecuzione degli esperimenti e negli allevamenti.

RIASSUNTO

I caratteri *knock-down resistance* (*kdr*) e *plexus* (*plx*) sono comuni in una popolazione naturale di mosche, vivente in una regione (Latina) periodicamente sottoposta a trattamenti estensivi con DDT e altri insetticidi di contatto. La ereditarietà di questi caratteri è stata analizzata incrociando un ceppo *kdr*, *plx* con due ceppi normali (+ *Tripoli* e + *arancio*). Il carattere *kdr* si eredita come monofattoriale, recessivo autosomico in accordo con le osservazioni di altri autori. I segregati *kdr* sono anche resistenti all'azione mortale del DDT, mentre non tutti gli individui

che vengono abbattuti muoiono. Questo mostra che l'omozigosi per *kdr* non è necessaria ma è sufficiente per la sopravvivenza al contatto con DDT.

Il carattere *plx* non segrega secondo i modelli mendeliani tipici. Gli incroci fatti con il ceppo +*Tripoli* hanno dato segreganti *plx*+ e *plx* tra i quali la mortalità in seguito ai trattamenti con DDT non fu distribuita a caso, essendo significativamente più elevata tra gli individui *plx*+.

I reperti dei vari autori sono ricordati e discussi.

SUMMARY

The characters *knock-down resistance* (*kdr*) and *plexus* (*plx*) are common among the natural fly population of a district (Latina) extensively treated with DDT and other contact insecticides. The inheritance of these two characters has been analised testing a *plx; kdr* stock. Crosses have been made with flies from two normal strains.

Knock-down resistence has been inherited as monofactorial, in agreement with other author's findings; the *knock-down resistant* segregants are also *kill-resistant;* the reverse is not true, as many *knock-down* sentitive flies are *kill-resistant.* That shows that homozygosity for *kdr* is not needed but is sufficient for assuring survival after contact with DDT. That might indicate lineage or pleiotropy.

The *plexus* character has not given regular mendelian segregations.

The mortality after the DDT test has been significantly higher among the normal than among the *plexus* flies segregated after the cross with the normal +*Tripoli* stock.

The findings of the previous autors are critically reviewed.

BIBLIOGRAFIA

1) - BODENSTEIN G., (1940). Die Ansloesung von Modifikationen und Mutationen bei *Musca domestica. Roux' Arch. Entw.*, *140*, 614-655.

2) - BRUCE W. N. e G. C. DECKER, (1950). Housefly tolerance for insecticides. *Soap and san. Chem.*, *26*, *n. 3*, 122-125; 145-147.

3) - BUSVINE J. R., (1951). Mechanism of resistance to insecticides in houseflies. *Nature 168*, 193-199.

4) - BUSVINE J. R., (1953). Forms of insecticide-resistance in house-flies and body lice. *Nature 171*, 118-122.

5) - BUSVINE J. R., (1953). Laboratory investigations with insecticide-resistant houseflies. *Trans. IX° Int. Cong. Ent. II°*, 335-339.

6) - BUSVINE J. R. e R. NASH, (1954). The potency and persistence of some new synthetic incesticides. *Bull Ent. Res.*, *44*, 371-376.

7) - D'ALESSANDRO G., CATALANO G., MARIANI M., SCERRINO E. e C. SMIRAGLIA-VALGUARNERA (1948). Sulla resistenza delle mosche al DDT. *Atti 21° Congr. Ass. Ital. Igiene*, 323 -337.

8) - D'ALESSANDRO G. e M. MARIANI, (1953). Osservazioni sulla eredità dei caratteri « resistenza » e « sensibilità » agli insetticidi clorurati in *Musca domestica* L. *Boll. Soc. It. Biol. Sper. 29*, 687-689.

9) - D'ALESSANDRO G. e M. MARIANI (1954). Osservazioni sulla eredità dei caratteri « resistenza » e « sensibilità » al DDT in *Musca domestica* L. *Riv. Parassitologia*, *15*, 85-94.

10) - HARRISON, C. M. (1951). Inheritance of resistance of DDT in the house - fly, *Musca domestica* L. *Nature* (*London*) 167, 855-856.

11) - HARRISON, C. M. (1952). The resistance of insects to insecticides. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *46*, 255-263.

12) - HARRISON, C. M. (1953). DDT - resistence and its inheritance in the housefly. *Jour. econ. Ent. 46*, 528-530.

13) - JAEGER J. FRANKLIN e SAM C. MUNSON (1949). Relationship between knock-down and survival time for DDT poisoned flies and roaches. *J. econ. Ent.*, *42*, 874-877.

14) - KEIDING J. (1953). Development of resistance in the field and studies of inheritance. *Trans. IX° Int. Cong. Ent.*, *2*, 340-345.

15) - LA FACE L. (1948): La mosca domestica, la sua importanza come vettore di malattie e la possibile esistenza di più razze nell'ambito della specie. *Rend. Ist. Sup. Sanità, XI-VI*, 1287-1345.

16) - LA FACE L. (1952): Sul comportamento ereditario della resistenza ad alcuni insetticidi in *Musca domestica*. *Riv. Parass.*, *13*, 57-60.

17 - LINQUIST A. W. e H. G. WILSON (1948). Development of a strain of flies resistant to DDT. *Science*, *107*, 276.

18) - MAELTZER, D. A. e R. L. KIRK (1953). A preliminary study of the genetice of DDT resistance in Housefly. *Aust. J. biol. Sc.*, *6*, 244-256.

19) - MARCH R. B. e E. L. METCALF (1950). Insecticide resistant flies. *Soap san. Chem.*, *26-7*, 121.

20) - MILANI R. (1954). Genetic aspects of the development of resistance to chemical insecticidies. *1° Symposium Int. sulla lotta contro gli insetti vettori di malattie trasmissibili*, 253-274. Ist. Sup. Sanità, Roma.

21) - MISSIROLI A. (1949). Il controllo degli insetti della casa e dell'uomo. *Ann. San. Pubb.*, *10-6*.

22) - NORTON, R. J. (1953). Inheritance of DDT tolerance in the housefly. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, *17*, 105-126. (cit. in *Rev. app. Ent. B*, *45*, 94).

23) - SACCÀ G. (1948). Sull'esistenza di mosche domestiche resistenti al DDT. Nota preliminare. *Ren. Ist. Sup. Sanità*, *11*, 123-124.

24) - SNYDER F. (1952). Conference on Insecticide Resistance and Insect Physiology (Discussione rel. L.E. Chadwichk). *Nat. Acad. Sc. - Nat. Res. Counc., pubb. n. 219.*

25) - STERNBURG J. e C. W. KEARNS (1950). Degradation of DDT by resistant and susceptible strains of housefly. *Ann. Ent. Soc. America*, *43*, 444-458.

26) - STERNBURG J., C. W. KEARNS e W. N. BRUCE (1950). Absorption and metabolism of DDT by resistant and susceptible housefly. *J. econ. Ent.*, *43*, 214-219.

27) - WIESMANN R. (1947). Untersuchungen ueber das physiologishe Verhalten von *Musca domestica* L. verschiedener Provenienzen. *Mittcilungen Schw. Entom. Geselschaft. 20*, 484-504.

28) - JOHNSON E. F., R. BOGART, A. W. LINDQUIST (1954). The resistance to DDT by housefly. Some genetic and environmental factors. (*). *Journal of Heredity*, *45*, 177-182.

(*) Questa pubblicazione giunse a mia conoscenza quando il presente lavoro era già tipograficamente composto; pur non avendo potuto commentarla nel testo ritengo opportuno citarla in questa sede (R. M.).

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

L'IMPIEGO DEGLI ESTERI FOSFORICI NELLA LOTTA CONTRO LA MOSCA DOMESTICA NELLA PROVINCIA DI LATINA

EZIO MOSNA (*) e MARIO ALESSANDRINI (**)

Anche se sino a tempi relativamente recenti la mosca domestica è stata comunemente considerata come un insetto noioso e spiacevole, l'importanza di questo insetto come vettore di malattie attirò da antica data l'attenzione dei medici e degli igienisti. Nel secolo presente rapidamente si andarono accumulando le prove sperimentali ed epidemiologiche sul ruolo che le mosche domestiche hanno nella propagazione di numerose malattie. A questo riguardo desideriamo ricordare un lavoro giovanile di Battista Grassi, dal titolo « Malefizi delle mosche » in cui potè dimostrare che le mosche possono introdurre nei loro intestini uova di vermi parassiti dell'uomo e depositarle ancora vitali con le feci; Egli, precorrendo lo sviluppo delle ricerche, già nel 1883 sostenne pertanto che germi patogeni potevano sopravvivere nell'intestino delle mosche ed essere diffusi con le loro feci.

La lotta contro la mosca domestica venne iniziata in Italia quaranta anni fa da Berlese, che previde prossimo il tempo in cui l'uomo avrebbe combattuto efficacemnte la mosca domestica, con grande vantaggio della salute pubblica.

Tale lotta, fino alla scoperta del DDT, fu portata principalmente contro l'insetto adulto a mezzo di esche avvelenate e contro le larve a mezzo di larvicidi, ed inoltre con l'applicazione di idonee misure igieniche. I risultati non furono però sempre soddisfacenti; va anche considerato che l'applicazione di questi metodi implicava spese non indifferenti e soprattutto un lavoro di difficile attuazione.

Con la comparsa del DDT si credette di poter finalmente realizzare le previsioni di Berlese ed arrivare così alla scomparsa della grave e costante minaccia alla salute pubblica, data dalla mosca domestica. Difatti, nel primo anno di applicazione del DDT, fatto a scopo antianofelico, scomparvero con

(*) *Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma.*
(**) *Comitato Provinciale Antimalarico di Latina.*

le zanzare anche le mosche domestiche, con grande vantaggio dell'igiene; dopo un anno però le mosche ricomparvero più numerose di prima, malgrado una seconda o terza irrorazione di DDT.

Oggi è ben noto l'insorgere del fenomeno di resistenza da parte di popolazioni di mosche domestiche al DDT. Questo fenomeno, osservato per la prima volta nel 1947 nelle Paludi Pontine, dopo un anno dal primo trattamento col DDT, in seguito all'uso generalizzato di questo prodotto, è andato dilagando nelle rimanenti zone d'Italia.

Nel 1947 non fu difficile la scelta di un nuovo insetticida per vincere tale resistenza. Le ricerche fatta in laboratorio sul ceppo di mosche DDT-resistenti avevano dimostrato che la resistenza era specifica e che per conseguenza altri insetticidi, Chlordane, Gammexane e Toxaphene, potevano essere impiegati con pieno successo. Preoccupava soltanto il fatto che nelle successive generazioni avute dalla linea DDT-resistente, si osservava non solo un aumento di resistenza al DDT, ma anche una minore sensibilità in rapporto ai ceppi normali verso gli altri insetticidi clorurati.

Nel 1948 fu usato il Chlordane, unitamente al DDT, nei principali centri urbani della provincia di Latina e nel 1949 anche in tutta la zona rurale della provincia, riuscendo ancora una volta ad eliminare le mosche da tutta l'area trattata.

Nel 1950 venne ripetuto lo stesso trattamento. Già in agosto comparvero però le mosche, prima in piccolo numero, poi in settembre in numero sempre maggiore fino ad occupare tutta la zona in ottobre.

Nelle ricerche di laboratorio il nuovo ceppo di mosche non dimostrò una resistenza specifica, come quella del ceppo selezionato verso il DDT, ma una resistenza multipla, polivalente, che si manifestava in modo più o meno marcato verso tutti i prodotti clorurati, DDT, Chlordane, Aldrin, Dieldrin, Gammaesano, Metoxicloro.

La conferma di questa resistenza polivalente si ebbe ben presto anche nel campo pratico: nel 1951 i trattamenti fatti a scopo antianofelico a Latina con Metoxicloro, e nel 1952 con Dieldrin, non dimostrarono alcuna azione verso le popolazioni delle mosche presenti.

Così pure esperimenti su scala ridotta compiuti a Latina con DDT potenziato a base di DMC e Pirolan dimostrarono che in poche generazioni appariva una notevole resistenza anche verso questi prodotti.

L'impiego degli esteri fosforici

Nel 1951 si era arrivati alla sconfortante conclusione che non si era più in grado di controllare le mosche domestiche con l'uso degli insetticidi clorurati e che la lotta stessa poteva pertanto essere ripresa con successo soltanto

quando si fosse disposto di nuovi insetticidi ad azione residua, efficaci anche contro le mosche resistenti ai suddetti prodotti.

Esistevano invero in tale periodo insetticidi a base di esteri fosforici (Parathion, TEPP, HETP) già largamente usati nel campo agricolo, che dimostravano nelle prove di laboratorio una completa azione contro le mosche resistenti. Il loro impiego nel campo pratico non era stato da noi preso in considerazione, data l'alta tossicità verso i vertebrati.

La comparsa di nuovi prodotti a base di esteri fosforici molto meno tossici — Diazinone e Malathion — ci spinsero a studiare la loro possibile applicazione nel campo pratico.

Esperimenti di laboratorio

Dai risultati di numerose ricerche di laboratorio fatte durante il 1952 con il Diazinone (Neocid 99 bagnabile al Diazinone 10%), si rilevò una costante completa azione del prodotto sia sulle mosche normali, sia su quelle DDT resistenti, sia su quelle a resistenza polivalente. L'abbattimento delle mosche è stato sempre totale, anche a dosi molto basse (5 ctgr. di sostanza attiva per m^2) e dopo tempi di contatto molto brevi (10 minuti). All'abbattimento delle mosche non si osservò successivamente la ripresa di alcun individuo.

Per quanto riguarda la durata dell'azione residua di contatto del Diazinone si osservò che alla fine della prima settimana tutte le concentrazioni della sostanza attiva usata (da 10 a 100 centigrammi per m^2) mantenevano ancora una azione insetticida totale; alla fine della terza settimana soltanto le concentrazioni superiori a 20 centigrammi, ed alla fine della quinta settimana la concentrazione di 100 centigrammi per m^2 conservavano ancora un'alta azione insetticida.

In successive esperienze, usando una pasta al 75% di DDT e 10% di Diazinone, sospendibile in acqua (20 centigrammi di Diazinone e gr. 1,40 di DDT per m^2) si osservò che l'azione di contatto residua si manteneva per circa 6 settimane.

In considerazione dell'alto costo del Diazinone, ed anche per limitare il contatto della popolazione umana con l'insetticida, in successive prove di laboratorio si cercò di vedere se fosse possibile ottenere un soddisfacente controllo delle mosche domestiche con la sola irrorazione di fascetti preparati con ramaglie a foglia resistente (leccio), da mettersi nell'interno delle cucine, ingressi e ricoveri animali.

Dalle ricerche effettuate risultò che un fascetto lungo 60-80 cm e del diametro di 30-40 cm. irrorato con 1 gr. di Diazinone sostanza attiva, posto al centro di una parete di una stanza di circa 60 m^3, era sufficiente per causare l'abbattimento delle mosche liberate nell'ambiente nello spazio di due ore nei primi tre giorni ed in un tempo maggiore nei giorni successivi. Dopo l'ottavo giorno dalla irrorazione del fascetto si osservò la sopravvivenza di alcune

mosche dopo 24 ore dalla loro immissione nella stanza; tale sopravvivenza divenne sempre maggiore nei giorni successivi, finchè dopo 15 giorni dalla irrorazione, la maggior parte delle mosche riusciva a sopravvivere dopo una permanenza di 24 ore nell'ambiente.

Ulteriori prove dimostrarono che l'abbattimento rapido osservato nei primi giorni, era dovuto non solo all'azione di contatto ma anche ad una azione fumigante del prodotto: mosche resistenti, chiuse in gabbiette di tulle, disposte agli angoli della stanza, cadevano infatti circa nello stesso tempo delle mosche lasciate libere nell'ambiente. Nelle susseguenti ricerche, in cui la finestra e la porta erano solo protette da un velo, l'azione fumigante del Diazinone fu appena rilevabile, mentre l'abbattimento delle mosche libere si verificava dopo tre-quattro ore, in un tempo cioè alquanto superiore a quello osservato in ambiente del tutto chiuso. Altre esperienze dimostrarono che l'azione fumigante del Diazinone era del tutto trascurabile anche ad ambiente chiuso, se il prodotto veniva irrorato su pareti intonacate a calce.

Per le suddette osservazioni, prima di passare all'applicazione del metodo nel campo pratico, abbiamo ritenuto necessario controllare l'azione tossica fumigante del Diazinone verso i vertebrati. In una stanza di circa 40 m³ vennero poste 2 scimmie, 4 ratti e 4 topolini; ogni giorno per un periodo di 5 mesi furono irrorati con 2 grammi di sostanza attiva i fascetti appesi nella stanza stessa. In tutto questo periodo non fu possibile rilevare negli animali alcun segno di intossicazione.

Parallelamente alle ricerche con il Diazinone vennero eseguite delle prove con il Malathion. Anche per questo prodotto si rilevò una completa azione immediata sulle mosche domestiche di tutti i ceppi usati. Si osservò però che il Malathion ha una azione nettamente più debole di quella del Diazinone, sia contro le mosche resistenti che contro le mosche normalmente sensibili, qualora si usino concentrazioni molto basse (5 ctgr. per m²) e tempi di contatto molto brevi (10').

Anche la durata dell'azione residua di contatto risultò inferiore a quella del Diazinone: alla concentrazione di gr. 0,40 di sostanza attiva per m², l'azione residua si affievolìva verso la fine della seconda settimana ed alla fine della terza settimana l'azione dell'insetticida appariva quasi del tutto esaurita.

Esperimenti nel campo pratico

Sulla base dei su riportati risultati di laboratorio, si è passati nel 1953 alla sperimentazione nel campo pratico.

Per il trattamento vennero usati i seguenti prodotti:

1) una pasta al 75% di DDT e 10% di Diazinone, sospendibile in acqua, fornita dalla Società Geigy di Basilea.

2) una soluzione di Malathion al 50%, emulsionabile in acqua, fornita dalla New York Mercantile Corporation.

Data la nostra scarsa conoscenza sulla tossicità del Diazinone e del Malathion per l'uomo e per gli animali, qualora gli insetticidi fossero irrorati in ambienti confinati, l'impiego su vasta scala ci metteva di fronte a possibili gravi responsabilità. Per questa considerazione si decise di trattare per il primo anno soltanto la zona rurale circostante alla città di Latina, così da permettere più facilmente un rigoroso controllo durante e dopo l'irrorazione del prodotto.

Basandosi sui risultati conseguiti negli anni precedenti con il Chlordane, si stabilì di irrorare soltanto le pareti degli ambienti usati per cucina, ingressi, e ricoveri animali; tale metodo, con il Chlordane, si era infatti dimostrato sufficiente per mantenere liberi da mosche domestiche tutti gli ambienti della casa, trattati e non trattati.

Per l'esperimento con l'uso di fascetti si stabilì di collocarli egualmente soltanto negli ambienti suddetti, ed in numero in rapporto alla cubatura dell'ambiente; generalmente vennero distribuiti 1-2 fascetti per cucina, 1 per ingresso e 3-4 per ricovero animale.

La zona rurale scelta per la sperimentazione racchiudeva nella sua area 785 case coloniche, con una popolazione di oltre 7.000 abitanti. Detta zona venne divisa in tre settori, ciascuno dei quali ebbe un differente trattamento.

Nel primo settore, comprendente 385 case coloniche con una superficie da trattare di 93.480 m^2, venne usata una sospensione di DDT al 3% e Diazinone al 0,41% in acqua. Il trattamento venne ripetuto tre volte nell'anno, ad intervalli di 40 giorni; la quantità media di Diazinone irrorato è stata di gr. 0,18 di sostanza attiva per m^2 per ciascun trattamento.

Nel secondo settore, comprendente 98 case coloniche con una superficie da trattare di 20.920 m^2, venne usata una emulsione di Malathion all'1% in acqua. Il trattamento venne ripetuto 6 volte nell'anno, ad intervalli di 20 giorni; la quantità media di Malathion per m^2 e per ciascun trattamento è stata di gr. 0,40 di sostanza attiva.

Nel terzo settore, comprendente 302 case coloniche, vennero collocati 1851 fascetti, con una media di 6 fascetti per casa e trattati 8 volte nell'anno, ad intervalli di 15 giorni, con la suddetta sospensione di DDT e Diazinone; la quantità media di Diazinone per fascetto è stata di gr. 1 di sostanza attiva per ciascun trattamento.

Ai tre suddetti settori ne venne aggiunto un quarto, comprendente 20 case coloniche, che non vennero trattate e tenute quali stazioni di controllo.

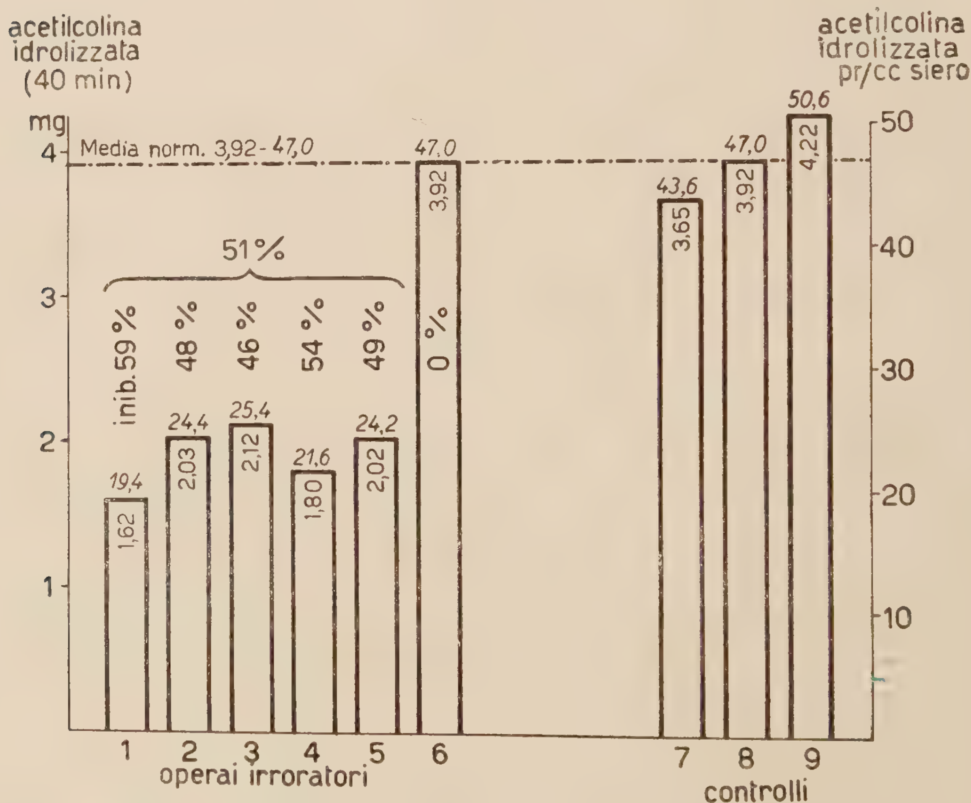
Per poter valutare i risultati conseguiti vennero fissate per ogni settore 20 stazioni di cattura, dando la preferenza agli ambienti adibiti ad uso cucina; il controllo delle mosche nelle stazioni fisse venne fatto una volta alla settimana, usando il comune nastro pigliamosche, esposto per 24 ore al centro dell'ambiente.

L'irrorazione degli insetticidi venne fatta da sei operai, sotto il controllo di due capisquadra, da noi giornalmente seguiti.

Per la protezione degli operai non vennero prese speciali misure precauzionali. Vennero loro fatte soltanto rispettare rigorosamente le norme elementari per l'impiego degli insetticidi di contatto; un solo operaio, in via sperimentale, fu fatto lavorare sin dal'inizio della campagna, protetto da una piccola maschera respiratoria. (mod. 71/624 - A 701 della Ditta Dräger di Colonia).

Per tutto il periodo di lavoro non abbiamo notato clinicamente alcuna manifestazione tossica da riferire agli insetticidi usati, sia nel personale che ha irrorato il prodotto, sia negli abitanti occupanti la case trattate.

Anche per gli animali domestici, che non sono stati allontanati dalle stalle durante le operazioni di irrorazione, non è stato segnalato dai proprietari disturbo alcuno.



Graf. 1 - Determinazione dell'attività della colinesterasi del sangue.

La determinazione però dell'attività della colinesterasi del sangue dei sei operai irroratori, praticata dopo circa quattro mesi di continuo lavoro, ha dimostrato invece dei valori molto bassi in cinque operai ed un valore normale

nel sesto e precisamente nell'operaio che aveva sempre lavorato protetto da una maschera respiratoria (graf. 1). Sebbene non sia possibile trarre delle conclusioni su questo unico caso, si deve tuttavia riconoscere che il fatto è nondimeno molto indicativo.

Risultati

I risultati conseguiti furono buoni in tutti e tre i settori trattati; il numero delle mosche catturate, riportato nella tabella annessa (Tab. 1) dimostra in modo evidente il successo del lavoro compiuto.

Si deve però osservare che l'uso del Diazinone e del Malathion non ha portato, a differenza di quanto si è osservato con il DDT e il Chlordane, a una completa scomparsa delle mosche dalle case trattate, e ciò neppure nei primi giorni dal trattamento: già dopo 24 ore dal trattamento era sempre possibile ritrovare, sia pure in numero molto basso, mosche domestiche in tutti gli ambienti, trattati e non trattati. Inoltre, mentre il DDT ed il Chlordane dimostrarono una completa azione sulle mosche in qualsiasi condizione di abitabilità, indipendentemente dalle condizioni igieniche della casa e del suolo circostante, i risultati ottenuti con il Diazinone ed il Malathion differirono invece in modo evidente da casa a casa: un successo tanto più completo quanto più la casa ed il suolo circostante erano ben tenuti.

TABELLA 1

NUMERO MEDIO SETTIMANALE DELLE MOSCHE DOMESTICHE CATTURATE NELLE STAZIONI FISSE

Settori	Insetticidi impiegati	Tipo di trattamento	N° trattamenti nell'anno	Periodicità del trattamento	Giugno 7	14	21	28	Luglio 5	12	19	26	Agosto 2	9	16	23	30	Settembre 6	13	20	27
I	Pasta al 75% di D.D.T. e 10% di Diazinone	Irrorazione delle pareti delle cucine, degli ingressi e dei ricoveri animali	3	40 gg.		484 [1]		45	32	18	23	30	45	22	20	14	28	34	48	42	67
II	Malathion 50% E.	Irrorazione delle pareti delle cucine, degli ingressi e dei ricoveri animali	6	20 gg.		628 [1]	9	52	7	55	12	6	13	17	6	16	9	15	25	7	12
III	Pasta al 75% di D.D.T. e 10% di Diazinone	Irrorazione di fascetti	8	15 gg.	586 [1]	85	73	67	30	53	28	14	18	22	16	23	24	26	22	27	61
IV	Settore di controllo				536	542	630	552	686	663	681	686	719	758	641	539	688	543	769	662	774

1) Prima del trattamento

Dall'insieme delle osservazioni fatte si poteva dedurre che pur non avendo il Diazinone ed il Malathion una azione totale contro le mosche domestiche, come quella a suo tempo dimostrata dal DDT e dal Chlordane, tuttavia agivano

in modo apprezzabile e pertanto potevano essere impiegati con successo nella lotta nel campo pratico.

Va notato che il costo della lotta contro le mosche domestiche con il Diazinone ed il Malathion è circa due volte superiore a quello della lotta con il Chlordane; infatti, mentre il costo pro capite nella lotta con il Chlordane è stato di Lit. 263,— con l'uso del Diazinone il costo pro capite è salito a Lit. 426,—, e con l'uso del Malathion a Lit. 512,—.

Sperimentazione con il diazinone nel 1954

Malgrado i buoni risultati conseguiti nel campo pratico con il Diazinone ed il Malathion nella lotta contro le mosche domestiche a resistenza polivalente, perchè l'uso di detti insetticidi fosse accettato ed esteso su vasta scala, due punti dovevano essere superati: l'alto costo della lotta ed il pericolo d'intossicazione verso l'uomo.

E' ovvio infatti che un servizio di sanità pubblica deve esser contenuto nei limiti delle finanze dello Stato o delle provincie o nello stesso tempo non rappresentare un rischio per gli operai addetti al lavoro e per gli abitanti delle zone trattate.

L'alto costo della lotta era dovuto in quella con il Diazinone soprattutto al prezzo dell'insetticida, in quella con il Malathion invece al costo della mano d'opera per i più numerosi trattamenti necessari durante la stagione. Di conseguenza, restando invariati i prezzi degli insetticidi, soltanto una riduzione del numero dei trattamenti poteva portare ad una riduzione del costo di questo importante servizio. Per questa ragione solo il Diazinone poteva esser preso in considerazione, data la sua maggior durata d'azione residua rispetto a quella del Malathion.

Dai primi risultati conseguiti in laboratorio e nel campo pratico si era potuto stabilire che la durata d'azione di tale insetticida permaneva buona per circa 40 giorni, si attenuava nei giorni successivi per esaurirsi del tutto dopo 60 giorni dal trattamento; era pertanto facilmente deducibile che con due soli trattamenti con un intervallo di circa 60 giorni, si doveva riuscire a raggiungere un buon controllo delle mosche per circa quattro mesi, e cioè per un periodo in tutto corrispondente a quello di massima riproduzione delle mosche nelle nostre regioni.

Si decise pertanto di usare per il trattamento nel 1954 il solo Diazinone praticando due irrorazioni nella stagione. Ciò permetteva una riduzione del costo pro capite di circa un terzo rispetto a quello dell'anno precedente.

Misure adottate per la protezione del personale addetto al lavoro

Per la protezione del personale addetto al lavoro vennero emanate delle norme precauzionali, per cui a tutti gli operai fu reso obbligo:

a) di portare la tuta durante il lavoro ben chiusa, di lasciarla alla fine del lavoro giornaliero nei rispettivi magazzini e di lavarla ogni fine settimana.

b) di portare durante il lavoro un cappello di paglia a larghe falde, pure da lasciare alla fine del lavoro nei rispettivi magazzini.

c) di usare guanti di gomma nella preparazione della sospensione dell'insetticida e durante i rifornimenti alla pompa e di lavarli bene con acqua prima di toglierli dalle mani.

d) di portare la maschera respiratoria (tipo Dräger), da tenersi non soltanto durante il lavoro d'irrorazione, ma anche per tutto il tempo in cui l'operaio sostava nell'ambiente in via di trattamento.

e) di chiudere porte e finestre dell'ambiente da irrorare per impedire le correnti d'aria e così evitare che parte dello spruzzo possa investire l'operaio.

f) di lavarsi le mani con acqua e sapone in occasione di ogni rifornimento d'insetticida.

g) di non fumare durante il lavoro d'irrorazione e durante le varie manipolazioni del prodotto.

L'osservanza di tali norme non presentò nel campo pratico particolari difficoltà e già dopo una settimana di lavoro venivano generalmente rispettate.

Per quanto riguarda ancora l'uso della maschera, non avendosi alcuna esperienza sulla durata dell'attività dei filtri verso il prodotto usato, si decise pertanto di far cambiare ad una metà degli operai i filtri ogni seconda settimana di lavoro, e di lasciare all'altra metà la facoltà di sostituire i filtri a loro richiesta, quando cioè avvertivano nella respirazione con la maschera un insolito e sgradevole odore.

Per la protezione degli abitanti delle case da trattare vennero seguite le seguenti norme:

a) allontanamento dalle cucine dei generi alimentari e degli utensili;

b) allontanamento degli abitanti dagli ambienti durante il trattamento.

Ricerche sulla colinesterasi del sangue

Per controllare l'efficienza delle misure prese a protezione degli operai si decise di determinare i valori della colinesterasi del sangue a tutto il personale addetto al lavoro, una volta alla settimana, iniziando la ricerca dal primo giorno di lavoro. Gli operai esaminati furono 69 e 459 gli esami complessivamente praticati durante il periodo di lavoro.

Si ritenne inoltre opportuno di praticare lo stesso esame anche a gruppi di abitanti delle case trattate. Vennero così esaminati 10 differenti gruppi di abitanti, a differente distanza di tempo dal trattamento della rispettiva casa e precisamente dopo 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 giorni dal trattamento. Complessivamente vennero esaminate 1.651 persone.

Tale ricerca venne ancora estesa, per controllo, ad un gruppo di 142 abi-

tanti appartenenti ad un centro rurale non trattato e lontano dalla zona trattata.

La determinazione della colinesterasi fu fatta secondo il metodo di LIMPEROS e RANTA, con le modificazioni apportate al metodo da DAVIES e NICHOLS, del « Chemical Defence Experimental Establishements » di Porton (Londra).

Questo metodo non presentò difficoltà di applicazione nel campo pratico, dato la piccola quantità di sangue (20 mmc.) e la semplice attrezzatura necessaria. Il valore dell'attività della colinesterasi viene rilevato dal tempo necessario all'enzima contenuto nel sangue in toto a scindere una data quantità di acetilcolina, ad una determinata temperatura. Nella nostra ricerca vennero considerati quali valori normali i tempi di reazione non superiori a 24 minuti. ad una temperatura non oltre i 24°C.; tempi di reazione superiori vennero considerati quali indici di inibizione dell'attività della colinesterasi, inibizione tanto più marcata quanto più lungo il tempo di reazione.

Sul comportamento della colinesterasi del sangue nel personale addetto al lavoro con il Diazinone, si è rilevato:

a) I 69 operai esaminati prima dell'inizio del lavoro hanno presentato tempi di reazione normali, cioè entro limiti di tempo tra 13 e 24 minuti.

b) I successivi esami, praticati una volta alla settimana per tutto il periodo di lavoro, hanno dato in 54 operai (78%) tempi di reazione corrispondenti a quelli iniziali, ed in 15 operai (22%) un aumento dei tempi di reazione sino ad un massimo di 46 minuti.

c) L'aumento del tempo di reazione venne osservato soltanto in quegli operai che dopo un periodo di lavoro tra 21 e 28 giorni non avevano ancora sostituito il filtro della maschera. Reso obbligatorio il cambio del filtro ogni 12 giorni di lavoro, i successivi esami dimostrarono sempre valori normali.

d) Gli operai con inibizione della colinesterasi non hanno accusato disturbi e così pure un accurato esame non fece rilevare sintomatologia alcuna.

Dalle osservazioni fatte si può pertanto dedurre che le misure prese per la tutela degli operai corrispondono pienamente allo scopo.

Per quanto riguarda il comportamento della colinesterasi del sangue nei differenti gruppi di abitanti esaminati, si è rilevato:

a) Nel gruppo di popolazione normale, abitante fuori della zona trattata, i tempi di reazione hanno presentato una variabilità alquanto vasta e precisamente valori tra 14 e 24 minuti nel 96% e tempi tra 25 e 35 minuti nel 4% degli esaminati.

b) In tutti i 10 gruppi di abitanti della zona trattata, la frequenza dei valori dei tempi di reazione ha presentata una distribuzione del tutto paragonabile a quella del gruppo normale.

Si può pertanto dedurre che l'uso del Diazinone in ambienti confinati non ha portato a rilevabili modificazioni nella curva dei valori della colinesterasi nella popolazione della zona trattata.

Il trattamento con Diazinone

Per il trattamento con il Diazinone, da irrorare per due volte nella stagione con un intervallo di 60 giorni, venne scelta una zona rurale di circa 156 km^2, racchiudente nella sua area 1148 case coloniche con una popolazione di 10.745 abitanti e al centro la città di Latina, da non trattare, con oltre 20.000 abitanti.

Il primo trattamento di questa zona venne fatto durante il mese di giugno, il secondo in agosto, a distanza di 60 giorni dall'inizio del primo. Per il lavoro vennero impiegati nove operai irroratori, guidati da tre caposquadra; complessivamente vennero irrorati Kg. 1.452 di pasta al DDT 75% e Diazinone 10% su una superficia di 766.530 m^2; la quantità media di Diazinone irrorato per m^2 è stata di gr. 0,18 di sostanza attiva per ciascun trattamento.

Per poter raccogliere inoltre un maggior numero di dati sull'uso del Diazinone nel campo pratico si stabilì di usare per il trattamento antianofelico, che dal 1946 veniva fatto una volta all'anno in tutta la zona malarica della provincia con DDT, la pasta al DDT ed al Diazinone, limitando l'irrorazione del prodotto alle cucine, ingressi e ricoveri animali. Per questo lavoro vennero impiegate altre tredici squadre di quattro operai ciascuna che dal 14 giugno alla fine di luglio irrorarono Kg. 5.115 di pasta al DDT 75% e Diazinone 10%, su una superficie di 3.144.470 m^2. La quantità media di Diazinone per m^2 è stata di gr. 0,17 di sostanza attiva.

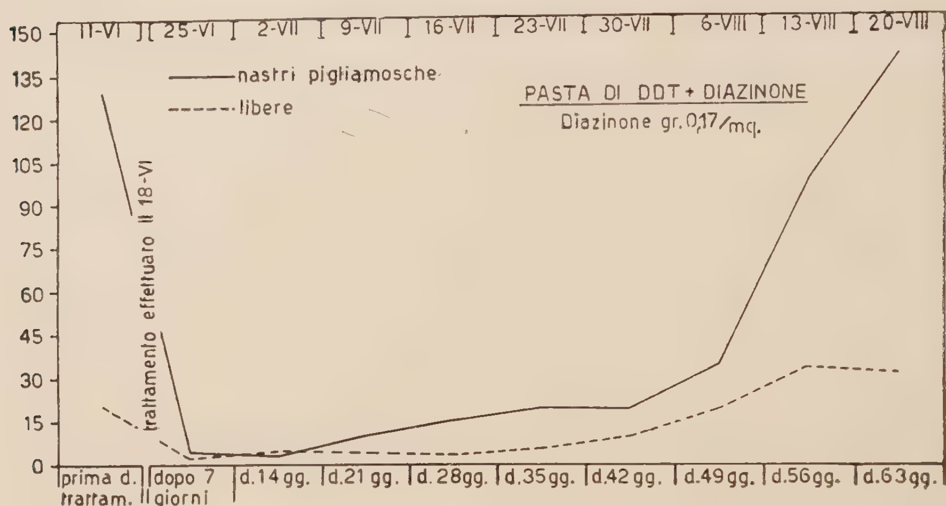
Per poter valutare i risultati conseguiti dall'applicazione del Diazinone nella lotta contro la mosca domestica, vennero fissate 120 stazioni nella zona trattata una sola volta e 20 stazioni in quella trattata due volte, dando la preferenza agli ambienti adibiti ad uso cucina. Come nell'anno precedente, la cattura delle mosche venne fatta una volta la settimana, usando i comuni nastri pigliamosche.

Oltre questo controllo settimanale, ogni giorno vennero ispezionati numerosi altri ambienti, trattati e non trattati, nei differenti settori della zona, ricorrendo al semplice conteggio delle mosche presenti negli ambienti. Certamente con tale metodo è quasi impossibile potere valutare con precisione la densità delle mosche, data la grande mobilità di questo insetto; quando però l'azione di un insetticida porta ad una riduzione, se non alla scomparsa totale dell'insetto combattuto, la valutazione della densità fatta in ambienti ristretti non riesce difficile anche ricorrendo al semplice conteggio.

Risultati

I risultati conseguiti nella zona trattata una sola volta riconfermarono che l'azione residua dell'insetticida permane buona per oltre 40 giorni, per attenuarsi successivamente sino ad esaurirsi quasi del tutto dopo 60 giorni dall'applicazione. Difatti, come si può desumere dall'annesso grafico (grf. n. 2),

che riporta il numero medio settimanale delle mosche domestiche catturate nelle stazioni fisse, in tutti gli ambienti, trattati e non trattati, si osservò una densità di mosche molto bassa per circa 40 giorni, per raggiungere dopo 60 giorni dal trattamento una densità abbastanza elevata.



Graf. 2 - Numero medio settimanale delle mosche nelle stazioni fisse (cucine).

Tenendo ancor presente che nella area trattata si riscontrano case nuove e pulite (Agro Pontino), antiche case con muri mal conservati (zona sud orientale) e villagi di capanne costruiti con canna palustre, con paglia o con legno (Piana di Fondi), il risultato conseguito si può riferire a paesi che presentano tutte le possibili condizioni di abitabilità.

Nella zona rurale sottoposta a due trattamenti si raggiunse pienamente lo scopo prefisso: per un periodo di circa 4 mesi si osservò una densità di mosche molto bassa in tutti gli ambienti di abitazione, trattati e non trattati. Soltanto per breve tempo, e precisamente 10 giorni circa prima dell'inizio del secondo trattamento, si notò un relativo aumento nel numero delle mosche, aumento che non raggiunse però valori così elevati da compromettere l'esito della campagna e che fu ben presto superato a seguito della seconda irrorazione.

Ancor più evidente appare il risultato se si tiene conto delle nostre ispezioni giornaliere, in cui la valutazione della densità delle mosche venne fatta ricorrendo al semplice conteggio delle mosche presenti negli ambienti; i risultati riportati nella tabella annessa (Tab. 2) dimostrano chiaramente il successo del lavoro compiuto.

TABELLA 2

Numero medio settimanale delle mosche domestiche nelle stazioni fisse.

	Giugno		Luglio					Agosto				Settembre				Ottobre	
	18	25	2	9	16	23	30	6	13	20	27	3	10	17	24	1	8
N. mosche catturate	17	16	10	15	19	18	24	39	128	10	18	12	23	—	—	—	—
N. mosche libere	3	2	4	3	3	5	10	12	32	2	1	4	7	6	9	12	8

E' da notare ancora che nella città di Latina, non trattata, situata al centro della zona rurale trattata due volte, si osservò la quasi assenza di mosche domestiche durante tutta la stagione.

CONCLUSIONE

I risultati conseguiti ci permettono di concludere che due soli trattamenti con una sospensione di DDT al 3% e Diazinone al 0,41% in acqua, praticati a distanza di 50-60 giorni l'uno dall'altro nelle sole cucine, ingressi e ricoveri animali possono risolvere la lotta contro le mosche domestiche resistenti agli insetticidi clorurati in tutte le zone rurali d'Italia, in qualsiasi condizione di abitabilità.

Dato che l'azione residua del Diazinone non si prolunga oltre i 60 giorni dal trattamento, l'irrorazione dell'insetticida deve essere eseguito durante il mese di giugno e ripetuto in agosto, così da far coincidere l'esaurimento dell'azione insetticida con la stagione in cui le mosche domestiche diminuiscono naturalmente di numero.

Dalla nostra esperienza di quest'anno, non sembra che esistano, ove vengano usate le cautele da noi indicate, pericoli d'intossicazione a mezzo del Diazinone per l'uomo e per gli animali, per cui si debbano raccomandare limitazioni nell'uso di questo prodotto, limitazioni che sono invece ancora oggi in atto a causa dell'elevato costo del trattamento.

RIASSUNTO

Gli A. A. illustrano le ricerche compiute in laboratorio con i nuovi insetticidi a base di esteri fosforici — Diazinone e Malathion — su differenti ceppi di mosche domestiche e riportano i risultati ottenuti nel campo pratico. Benchè questi nuovi prodotti non abbiano un'azione totale come quella già dimostrata dal DDT e dal Clordane, tuttavia agiscono in modo apprezzabile e pertanto possono essere impiegati con successo nella lotta contro le mosche domestiche resistenti agli insetticidi clorurati.

Mettono in rilievo che il Diazinone, nella formulazione da loro usata, applicato due volte all'anno, con un intervallo di 60 giorni, nelle sole cucine, ingressi e ricoveri

animali, riesce a mantenere una densità di mosche molto bassa in tutti gli ambienti di abitazione, trattati e non trattati, per un periodo di circa 4 mesi e pertanto per tutto il periodo di massima riproduzione.

Discutono i possibili rischi derivanti dall'uso del Diazinone in ambienti confinati, soprattutto per gli operai irroratori; dai valori dell'attività della colinesterasi del sangue osservati nel personale addetto al lavoro ed in gruppi di popolazione della zona trattata, ritengono improbabile la possibilità di intossicazione a mezzo del prodotto nell'uomo, quando vengano usate sul lavoro le norme da loro applicate.

Fanno infine presente che l'alto prezzo di questi insetticidi ed il costo della mano d'opera necessaria portano per ora a limitazioni nell'uso di questi prodotti su vasta scala.

SUMMARY

The authors describe their laboratory experiments on the latest organic phosphates insecticides (Diazinone and Malathion) on various strains of houseflies and report on the field results obtained. Eventhough these products do not have a total action as shown by DDT and Chlordane they possess a considerable insecticidal action and may be used successfully in the control of houseflies resistant to chlorinated insecticides.

The authors point out that Diazinone if employed at the given formulation, applied twice a year with an interval of 50-60 days in kitchens, halls and animal shelters only, may mantain a very low fly density in all premises, whether treated with insecticide or not, for a period of about 4 months, and may lead, therefore, to a satisfactory control of houseflies for the whole period of high fly density.

The possible hazards deriving from the use of Diazinone in confined premises, especially for spraying teams, are discussed. From the analysis of the data derived from blood cholinesterase activity of the spraying personnel and of groups of people from the treated zone, the authors exclude the possibility of human intoxication by this organic phosphate if the proper spraying rules are enforced.

It is pointed out that the high price of these insecticides and the man labor cost limits the use on a large scale of these products.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

DATA ON THE EPIDEMIOLOGY AND THE PROPHYLAXIS OF AMEBIASIS IN CHILE (*)

AMADOR NEGHME (**) and ROBERTO SILVA (***)

1. - Introduction.

If we compare our present knowledge of amebiasis in Chile with that existing 20 years ago, when we started the studies about this affection, we may infer how much our knowledge has advanced. In 1931, when the Medical Society of Santiago discussed the problem of amebiasis in its Annual Meeting, and reached the conclusion that it was much more frequent than it was believed to be (6) a manifest skepticism prevailed among the physicians, because only on a few occasions and only in acute dysenteric pictures, the laboratory discovered the *Entamoeba histolytica*, confirming the clinical suspicion. Furthermore, this protozoon was frequently confused with commensal amebas, such as *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* and others. Therefore, when we joined the Institute of Biology in 1933, the late Professor Giovanni Noé recommended that we work in the elucidation of this problem in our country. One of the first steps of our work, was to improve the diagnostic procedures by simplifying them as much as possible and by applying other methods of greater efficiency. In this manner, we started the study of amebiasis and, successively we applied the best direct procedures for the examination of the trophozoites in acute cases in fresh and stained smears, the concentration technique for the chronic sufferers from amebiasis; the cytodiagnostic and the proctoscopic examination and the demonstration of the ameba in exudates so obtained. We also obtained successfully the culture of *E. histolytica* in articial media. As we advanced

---

(*) Presented before the « Gastro-enterological Society of Chile », Santiago, December 9, 1953.It was also read before a seminary group in the Division of Parasitology headed by Prof. E. C. Faust, Tulane University, New Orleans, La. USA.

(**) *Institut of Biology* « Juan Noé », *Department of Parasitology, University of Chile.* (Director: Prof. A. Neghme).

(***) *Department of Parasitology, University of Chile. National Public Health Service of Chile.*

in our studies, we became more and more convinced of the high prevalence of the infection as well as of the polymorphism of its symptomatology. It was obvious that very frequently, the various phases of the amebic infections were clinically mistaken for other disease conditions from the gastro-intestinal tract. So, we emphasized the necessity of investigating the ameba in patients suffering with chronic diarrheas, alone or alternating with constipation; or in patients with symptoms of chronic appendicitis, gall-bladder disease or peptic ulcer. In this approach, we followed the suggestions of Prof. H. ALESSANDRI and we profited by the collaboration and experience of Dr. J. LERNER and Dr. P. GARCIA P. Thus, in previous reports (1, 2, 9, 10, 11, 12, 13), we emphasized the high frequency of amebiasis which appeared to be the etiology in more than 25% of clinical cases suffering from diseases of the gastro-intestinal tract. The conclusions were similar in other university clinics of Santiago (5, 36), due to these combined efforts, a more precise and real knowledge of the symptomatology and the diagnosis of amebiasis was gradually being extended in the clinics of Santiago.

However, in spite of the improvement obtained up to date, some medical groups, especially those in the provinces, still are pratically unaware of the importance of this disease and there are even those who believe that ameba must only be investigated in the presence of disentery. Also, their treatments are usually insufficiently controlled being frequently the acute exacerbations of chronic amebiasis. On the other hand, the official statistics only report the «dysenteries» in general terms. The sanitation of the environment progresses very slowly and the educational work with the scope to influence the behavior of the patient and his relatives is only in the initial stage.

Under these circumstances, the decision of the Chilean Society of Gastroenterology to dedicate its first annual meetings convened last December in Santiago, to the analysis and discussion of the fundamental aspects of amebiasis was fully justified.

The opinion sustained by almost all the gastroenterology clinics of the hospitals in Santiago, and the examinations carried out in our laboratory during the last 10 years, seem to reveal an increase of the incidence and prevalence of amebiasis, which is due undoubtedly to the improvement of the diagnosis and to the increased number of people suffering with digestive troubles consulting the physician in the internal medicine or gastro-enterology services.

The comparison of our earlier surveys on healthy or apparently healthy people (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) and the stool examination in the diagnostics laboratories under our direction since 1935, indicated also (28, 29, 30) that the rates of prevalence and incidence of the amebiasis had an ascending tendency in Santiago.

We therefore proposed to inquire into the causes of this increase, which

is not an easy problem, if we consider the complexity of the different factors involved. In order to clear up, this matter relying on the classic knowledge about the epidemiology of the amebiasis, we intended to analyze the actual frequency of amebiasis and the environmental and personal factors which favor the trasmission of this parasite in the province of Santiago.

At the beginning, we examined the rural inhabitants of the periphery of the city of Santiago, because most of the vegetables and fruits which are consumed raw, come from these zones. It was important to examine the populations living in the neighbourhood of the sources of the drinking water. These inquiries comprised the inhabitants of the Cajón del Rio Maipo, Pirque, Renca, Quinta Normal, Barrancas, San Miguel, Los Cerrillos, Maipú and Melipilla, and their results proved that they were heavily infected by intestinal parasites and particularly, wich *E. histolytica,* in proportions oscillating between 20 to 40% of the examined individuals (28, 29).

The precarious sanitation of these rural zones and the lack of hygienic habits of the individuals, explained these figures. Indeed, our epidemiologic inquiries and observations revealed defective excreta disposal, for in some places (37) 64.5% of the persons defecated in the open field, 27.6% used latrines placed over irrigation ditches, 6.6% in sanitary privies and only 1% lived in houses with septic tanks. In regard to drinking water by far the majority (65.3%) drink from irrigation ditches, wells and springs, and only 17% used chlorinated drinking water. It is extraordinarily common to irrigate the vegetables with water contamined with fecal material. Also the large fly population further this contamination.

We also proved that an adequate protection of the source of water supply and of aqueducts of the drinking water was lacking and that the city of Santiago was supplied with water not submitted to any filtration process.

All these combined factors would undoubtly facilitate the transmission of the amebic cysts from the infected rural areas to the town, contributing to maintain an endemic state, thereby exposing individuals of every age, sex and social and cultural conditions to the risk of the infection. The amebic infection may be acquired through the vegetables which have come from the country and are consumed poorly washed and raw; through drinking water and through certain foods, like milk, and perhaps butter and fresh cheese, contaminated by carriers during their preparation.

Therefore it became necessary to investigate the epidemiological factors with more details; thus, at the beginning of 1951, we proceeded to examine the drinking water of Santiago for the purpose of inquiring into the presence of cysts and eggs of parasites (4). Large water samples from the sedimentation reservoirs and the water pipes of the plant of «Las Vizcachas», located 10 miles from Santiago, at a time when the sand filters were not yet installed, were collected. The examination of 310 liters of water permitted us to observe

various cysts morphologically similar, though somewhat altered, to those of *Entamoeba histolytica* and, furthermore, eggs of *Hymenolepis nana*. Improving the examination technique, recently Artigas has been able to demonstrate the presence of some cysts morphologically very like those of *E. histolytica* in the drinking water which supplies the city of Osorno (3, 4, 34).

The examination of samples of irrigation water contaminated with excreta, from rural properties in the neighbourhood of Santiago, demonstrated the presence of cysts of *Entamoeba coli, Endolimax nana, Giardia lamblia* and *Ascaris lumbricoides* eggs and some cysts highly suspected to correspond to *Entamoeba histolytica* (34). The vegetables obtained from the same region, on the other hand, only demonstrated the presence of eggs of *Trichuris trichiura*. The investigation of these epidemiological factors and others, such as the flies, the cockroaches and the rats, is in progress.

2. - Material and methods.

With the purpose of obtaining reliable data on the prevalence of amebiasis throughout the national territory, a survey was undertaken. Up to 1948, our data were insufficient, because the previous enteroparasitic surveys were few or limited to non-representative groups of individuals who were living together in communities, such as the recruits of the Army or the people sheltered in certain institutions. The coprologic surveys started in 1949, on the following basis:

a) Samples of both rural and suburban populations of the whole country were examined.

b) The individuals to be examined were taken at random, without any selection.

c) Individuals of every age were examined, being its number in each group of age in the same proportion as in the general population.

d) Both female and male individuals were equally represented.

e) In each province, sectors which presented different characteristics among themselves, v. gr., as to the topography, water supply and activities (miners, farmers, etc.) were surveyed.

f) In order to establish the magnitude of the sample to be taken, the survey of 10% of each population with less than 1000 inhabitants and of 5% and proportionally less for the more numerous populations was arranged.

We intented to carry out this survey in as short a period as possible, which we initially established as 4 years.

On this occasion, we shall not analyze the multiple difficulties we had to face, and the public health education we had to perform, in order to overcome the distrust and the resistance of the individuals. We also admit that

it was not always possible to accomplish the ideal pattern we had set; therefore our study has not been entirely perfect and suffers from a certain degree of unavoidably selection of the individuals. The most serious of all the criticisms we should admit to ourselves, is that we have carried out the parasitologic examination of only one coprologic sample for each individual and therefore our figures are below the reality.

Each specimen was diluted with a formol-saline solution and was examined under the microscope by the following three methods:

a) A direct smear of the fecal material.

b) A direct smear of the sample stained with iodine.

c) An iodine stained sample prepared by a modification of the Telemann centrifugal technic. Since 1933, this modification has been routinely used in our laboratories. It consists in mixing the fecal material with ether and to centrifugate it for 5 minutes, at a speed of 1800 revolutions. The sediment is collected with a pipette, stained with a drop of iodine and examined under a coverglass.

Since 1952 on, we are using the MIF stain (38) instead of iodine, with very good results. All *E. histolytica* cysts were examined under oil immersion magnification. We did not make efforts to find trophozoite forms of amebas in our surveys specimens: but in fresh passed stools of patients we looked for them and frequently we made iron hematoxilin stains using the TOMPKINS and MILLER technic (39).

3. - RESULTS.

Although we examined more than 16.000 individuals, we have eliminated, in this report, some data that due to defects of selection have only relative value. This reduces the number of the examined persons to 14.992.

Obviously, the results obtained so far may not be applied to the total population of each of the studied provinces. But, on the other hand, the great number of small surveys performed in different places, has demonstrated a certain distribution of the frequency of intestinal parasites, which gives a special pattern to each one of the sectors of the national territory. In outline and provisionally, we have divided the country into the following zones:

Northern Zones. (The provinces from Tarapacá to Aconcagua).

Central Zone (The provinces from Santiago and Valparaíso to Maule).

Southern Zone (The provinces from Nuble to the South).

We believe that every reference to the epidemiology of the amebiasis would be incomplete, if it would not include, in addition to the *E. histolytica* findings, other species of commensal amebas, such as *Entamoeba coli* and *Endolimax nana*. Although these protozoa do not have any importance from the pathogenic point of view, we believe they have importance from the epidemiologic standpoint, because their transmission mechanisms are identical with that of

E. histolytica and their mutual association is extraordinarily frequent. In fact, the presence of cysts of *E. coli* and *E. nana* indicates the ingestion of food or drink contamined with fecal material and, consequently, that the probability of an infection by *E. histolytica* is high (8). On all events, a high rate of the infection by *E. coli* and *E. nana* must be considered as an indirect index of the lack or inadequacy of the sanitation of a community.

Table 1 and graph 1 summarize our findings regarding amoebiasis in the 14.992 rural individuals examined beetween 1949 to 1952. Our data show that this is one of the parasitosis which are found in the diverse latitudes of the country, from the southern parallel 18.5° to 55°. Generally speaking, its greatest prevalence is found in the Central Zone, with 23.8% of *E. histolytica*. We can add that its prevalence is higher in the neighbourhood of the centers with the greatest density of population.

TABLE 1

Amoebiasis in Chile: Prevalence in rural and sub-urban zones (from 1949 to 1952).

	Number of Examined	*E. histolytica*		*E. coli*		*E. nana*	
		Number	Per Cent	Number	Per Cent	Number	Per Cent
North Zone . .	2.192	309	14.09	1.282	58.48	479	21.85
Central Zone . .	6 892	1.644	23.85	5 658	82.09	2.147	31.15
South Zone . .	5.908	679	11.49	3.428	58.02	1.139	19.27
	14.992	2.632	17.55	10.368	69.15	3.765	25.00

The prevalence diminishes in the Northern and Southern Zones, with figures of 14.09 and 11.49%, respectively.

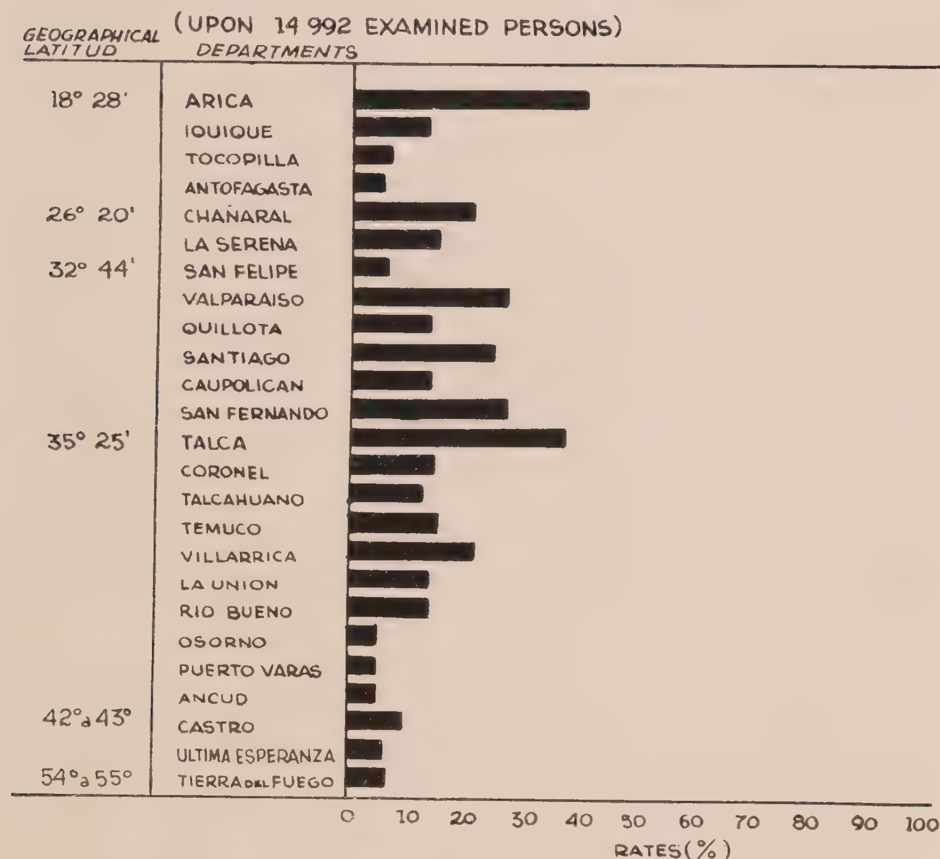
However, while it reaches 6.03% in « Tierra del Fuego » in the far south in Arica (far North) it amounts to 46.11%.

The rate of amebic infection of Arica is partly explained by its subtropical climate. In the remainder of the Northern Zone (that is from Iquique to Coquimbo) the conditions are not favorable to *E. histolytica* owing to the extreme dryness of the soil, the burning sun and the scarcity of water; moreover, the consumption of vegetables is very reduced in the provinces of Tarapacá and Antofagasta. It is known that desiccation destroys the ameba cysts, so the transmission of the infection in this zone, would be generally accomplished by the direct family contacts, which is obviously favored by the crowded living condition and by the lack of personal hygiene.

On the other hand, in the Southern Zone, though there exist the same favorable factors, like the fecal contamination of the soil and the water courses,

the prevalence is less than in the Central Zone, because the heavy rain fall and large water courses facilitate the dilution of the fecal materials and, consequently, of the amebic cysts, so that the infection risk of the inhabitants is somewhat diminished.

The high prevalence of infection by *Entamoeba coli* (between 58 and 82%)



Graph 1

and by *Endolimax nana* (19 to 31%) in our rural zones, especially in the center of the country, may also be inferred from table 1.

If we compute the global data for the country, we have, approximately 17.15% of infection by *E. histolytica,* 69.15% of infection by *E. coli* and 25% of infection by *Endolimax nana,* high numbers which immediately raise the question of the medical and sanitary implications of the problem of amebiasis in our country.

4. - Study of amebiasis in Santiago.

As an important complement to our national epidemiological study, we considered useful to gather informations from a selected group of patients who present digestive discomforts, on account of which they consult to the Policlinic of Parasitic Diseases of our Institute. Likewise, it seemed interesting to us to know the results of the examinations of patients submitted for diagnostic purposes by professionals, health centers or out-patient and hospitals of the capital. Thus, from 1949 to 1952, 8.494 individuals have been examined and 1.624 were cases of amebiasis (19.12%).

Since 1952, for the purpose of contributing to a better clinical and epidemiological knowledge and control of the therapy, we have extended the parasitologic investigation to the family group. As a rule, every patient, who consults our Department, is asked to submit a series of six stool specimens every other day, over a period of 12 to 15 days; in this manner, we increase the possibilities of finding *E. histolytica* to a high degree; once the diagnosis of amebiasis is confirmed, we proceed to demand six examinations from each one of the persons who live with the patient.

This procedure of looking for family cases, has permitted us to diagnose amebiasis in 90 families, one or more individuals in each one. There was even one family in which 18 persons were infected. The association of *E. histolytica* with the commensal amebas is very frequent; of the 1.624 patients of amebiasis, only five had *E. histolytica* alone, after a series of six stool examination; the remainder presented the association between *E. histolytica* and the commensal amebas. The same was true for the family contacts of the patients of amebiasis.

* * *

The study of the 1.624 patients with amebiasis, will permit us to analyze the sex and age distribution of these patients and to compare these data with those obtained in the national inquiry.

a) *Sex distribution.*

Of the 1.624 patients diagnosed in our laboratory, 891 were women (54.86%) and 733 were men (45.14%). (See table 2). However, these figures are not conclusive and are surely influenced by selection, because the number of consultations of women was greater than that of men in the Policlinic of Parasitic Diseases and, consequently, the number of medical attentions and examinations were greater for the women, which increased the probability of diagnosing the amebiasis in them.

TABLE 2

Cases of amoebiasis diagnosed in the laboratories of the department of Parasitology (from 1949 to 1952): Sex distribution

Sex	Number	Per cent
Male	733	45.14
Female	891	54 86
	1.624	100

Now then, if we consider what occurs in a group of rural populations surveyed at random, the figures of which are given in table 3, we see that a predominance of the amebiasis is observed in the female (54.57%) in the Northern Zone, whereas the above mentioned predominance is observed in the male in the Central and Southern Zones (58.18 and 52.57%, respectively). Finally if we consider the total number of amebic individuals in the country, we find a predominance of the parasitosis in the male (53.27%). Owing to these discrepancies, we do not yet feel ourselves authorized to elucidate this point, and we believe that a greater number of observations is necessary before we can give opinions in one sense or other.

TABLE 3

Amoebiasis in Chile. Rural and sub-urban population (from 1949 to 1952): Sex distribution

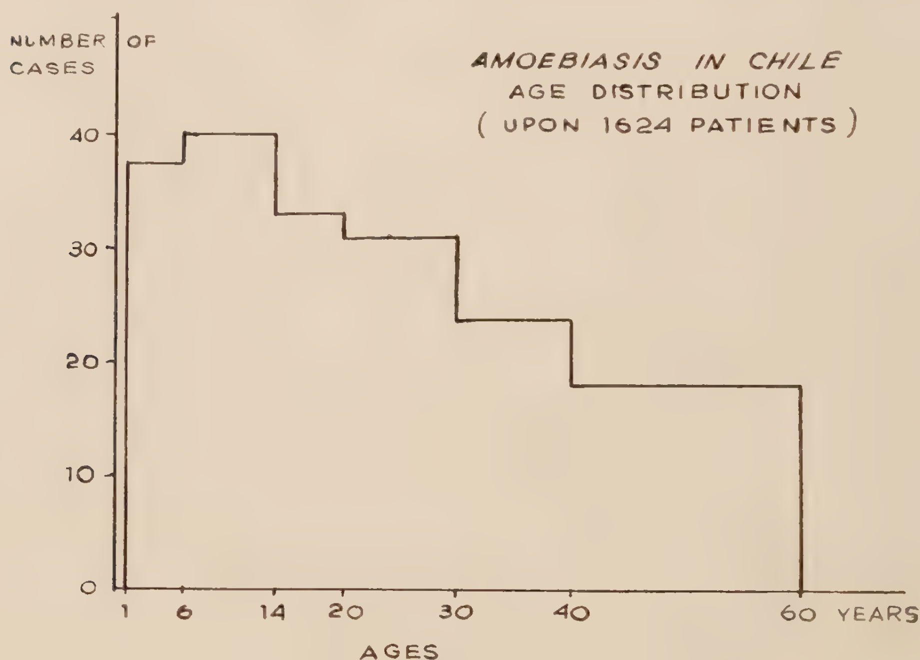
Zones	Number of infected persons	Male		Female	
		Number	Per cent	Number	Per cent
North . .	295	134	45.43	161	54.57
Central . .	550	320	58.18	230	41.82
South . .	544	286	52.57	258	47.43
	1.389	740	53.27	649	46 73

Those persons who think that women may be more exposed to the risk of the infection by their domestic occupations, the care of the children and the cleaning of the clothes and utensils, are perhaps right. However, we believe that man is equally exposed to the risk of the infection, because more often

he eats in different places, which facilitates the infection due to deficiencies in the preparation of the meals.

b) *Age distribution.*

Classically, it has been sustained that the greater prevalence of the disease is found in the second decade of life. In table 4 and in the graph 2, we show the data extracted from the analysis of our 1.642 patients of amebiasis It shows that the problem of amebiasis is serious between the first and the



Graph 2

30th year, especially in the group of 7 to 14 years old, in which it reaches the highest prevalence, declining sensibly during the older ages as the histotogram (Graph 2) shows. More than 50% of the diagnosed cases correspond to individuals belonging to 1 to 30 years of age.

The results of our national survey which we were able to review only in a group, contribute to reinforce our argument, as may be seen in table 5. The greatest prevalence of amebiasis in the individuals of the three Zones was also found in the age groups from 1 to 30 years. The group from 7 to 14 years old appears also to be the most infected (graph 3). A parallelism of rates of infection by *Entamoeba coli* and *Endolimax nana* with that by *E. histolytica* was also observed.

TABLE 4

Cases of amoebiasis diagnosed in the laboratories of the department of Parasitology (from 1949 to 1952): Age group distribution

Age Group	Number	Per cent
1-6	225	13.85
7-14	320	19.71
15-20	182	11.21
21-30	301	18.53
31-40	235	14.47
40 and more	361	22.23
	1 624	100.00

This age distribution induced us to study the problem of amebiasis among the school boys and girls of the province of Santiago, between the ages of 7 and 14 years. We found that 1.056 of 4.133 pupils examined in the suburban districts of Greater Santiago, or 25.55%, had an amebic infection. In table 6

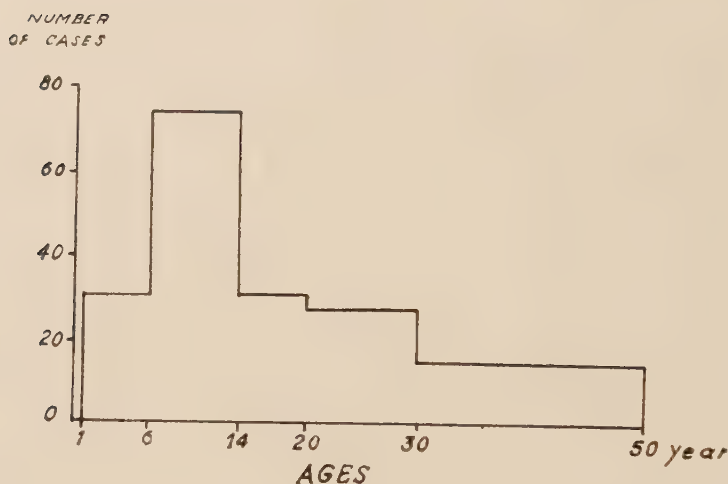
TABLE 5

Amoebiasis in Chile. Rural and sub-urban population (from 1949 to 1952): Age group distribution

Age Group	North Zone			Central Zone			South Zone		
	Total of examined	Total of infected	Per cent	Total of examined	Total of infected	Per cent	Total of examined	Total of infected	Per cent
1-6	334	33	9.88	396	64	16.16	1.176	88	7.48
7-14	871	93	10.67	1.208	305	25.24	1.488	186	12.50
15-20	143	40	27.97	200	41	20.50	626	104	16.61
21-30	253	52	20.55	335	94	28.05	760	137	18.02
31 and more	381	77	20.20	384	46	11.97	1.432	227	15.85
	1.982	295	14.88	2.523	550	21.79	5.482	742	13.53

we show the distribution by sectors for the city and the rates of infection by *E. coli* and *E. nana,* which are very high. These inquiries were made by means of the parasitological examination of only one faecal specimen. As they are based on a number of individuals which we judge to be representative of the schools of the different sectors, inasmuch as the number ranged from 10 to 25% of the school pupils of each sector, we have good reason to believe that above mentioned results, in weighted form, may be perfectly applied to the entire school population of Santiago.

Likewise, it seemed interesting to us to analyze the prevalence of amebiasis in the pre school age from 1 to 6 years. It had been sustained that amebiasis is rare in this age group. Although we cannot yet afford a definitive opinion,



Graph 3

as the group is small, the data supplied by inquiries, reveal high rates of amebic infection. In table 7, we give, as an example, the results of a survey carried out on a group living in a slum area called Cerro Blanco in

Table 6

Amoebiasis in scholars of Santiago (from 1949 to 1952)

Area	Number of Examined	*E. histolytica*		*E. coli*		*E. nana*	
		Number	Per Cent	Number	Per Cent	Number	Per Cent
North Area	1.174	279	23.76	960	81.77	443	37.73
East Area	1.207	280	23.19	970	80.36	336	27.83
West Area	814	245	30.09	682	83.78	270	33.16
South Area	938	252	26.86	743	79.21	249	26.54
	4.133	1.056	25.55	3.355	81.17	1.298	31.40

the city of Santiago. It demonstrates that 18 among 250 children of the first and second year of infancy were infected with *E. histolytica*. However, the highest rate was found among the children of 5 and 6 years of age.

As to infants, our experience is limited, since most of these patients are attend in the pediatric wards. Nevertheless, the information forwarded to us by our collaborators who take part in the study of this parasitosis in the pediatric clinics of the Hospitals Roberto del Rio and M. Arriarán, suggest that amebiasis appears rather frequently among the infants. We were concerned in studying the amebic infection of the parents and other relatives starting from an initial case in a baby, and as it was to be expected, we could demonstrate it rather regularly. It may be presumed that cases of family infection originate from the infection of those who prepare the food and mainly the mother; indeed, the prevalence of the amebiasis among infants can only be explained by the direct contact with the adults with whom they live, or through contamined food which is consumed raw or insufficiently cooked.

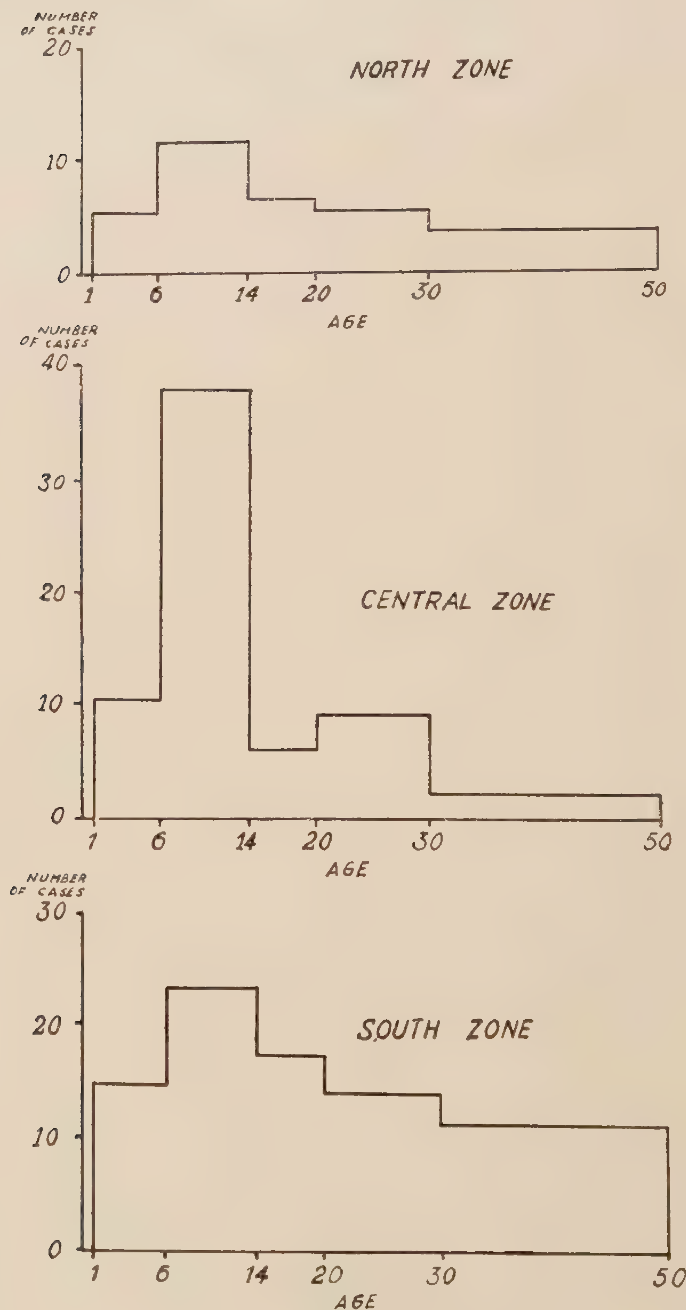
TABLE 7

Amoebiasis in pre-school age of Santiago: Slum area called «Cerro Blanco». 1952

Age Group	Number of Examined	*E. histolytica*		*E. coli*		*E. nana*	
		Number	Per Cent	Number	Per Cent	Number	Per Cent
Less than 2 years	42	1	2.38	16	38.09	8	19.05
3 »	56	2	3.75	22	39.27	13	23.21
4 »	88	3	3.40	28	31.81	16	18.18
5–6 »	64	12	18.75	50	78.12	43	67.18
	250	18	7.20	116	46.4	80	32 0

5. - DISCUSSION.

In addition to the effects of an unhealthy environment, direct contact, favored by a precarious personal hygiene, can play an important role in the dissemination of amebiasis. Credit is given to this possibility by the presence of amebiasis in young babies whose mothers, brothers or sisters are carriers of amebas as well as by families having parasitic infections often had two or more carriers of the same commensal and parasitic species. Our future investigations will be intended to elucidate this aspect of the problem which poses different questions: First, how to explain the figures of amebic infection confirmed in


AMOEBIASIS IN CHILE
AGE DISTRIBUTION IN THE DIFFERENT ZONES OF CHILE
NUMBER OF CASES
20
10
0
NORTH ZONE
1
6
14
20
30
50
AGE
NUMBER OF CASES
40
30
20
10
0
CENTRAL ZONE
1
6
14
20
30
50
AGE
NUMBER OF CASES
30
20
10
0
SOUTH ZONE
1
6
14
20
30
50
AGE

Graph 4

the provinces of the desert zones, where the environment is extremely unfavorable to the amebic cysts; we also do not understand the high findings of amebiasis in the Austral Zone, where, to judge by the data of our survey, the vegetables are irrigated with clean water, the greens are cultivated at home, the defecation in open fields very restricted and, finally, the climatic conditions, with frequent snowfalls, tend to prevent the transmission by soil, as happens in the central and southern parts of the country. We presume that the interfamily contacts may play an important role in the transmission of the parasitosis in those areas.

Our examinations of 14.992 healthy or apparently healthy individuals of rural and suburban zones of the country have revealed a fact, the transcendency of which must not be overlooked, namely, that only 10% of them were free of intestinal parasites. Consequently, it is logical to suppose that 100% of the examined populations have been exposed to the risk of amebic infection, or rather, that the population lives in an environment highly contamined by human excreta, and that the cysts of amebas will invade the individuals shortly after birth and the infection rate will increase with the age, from the youth to the maturity. It is evident that adult persons of more than 40 years generally present a lesser intensity of the infection, which probably indicates a degree of immunity which they have attained.

However, the medical significance of our findings remains to be determined with more accuracy: whether the thousands of individuals infected by *Entamoeba histolytica*, are only carriers or if a percentage of them are really sick. This is a problem open to investigation and directly related to the studies of the pathogenicity of the parasite which, according to the school of Craig and Faust, would always be a tissue parasite and which, according to numerous other authors, would normally live in the lumen and invade the wall only if certain favorable circumstances coincide (anaerobiosis, optimal pH, associated microbian flora, injuries of the wall). At any rate, the clinical attitude must not change and it is necessary to treat each carrier of amebas, whether he has or has not symptomatology, for we cannot predict the future evolution of the infection and the elimination of cysts represents a source of infection for new individuals in whom the ameba may find more favorable conditions for its pathogenic action than in the original individual.

6. - Prophylactic considerations.

The fecal contamination of the soil not only means the risk of amebic infection, but also the danger of infection with other intestinal, bacterial or parasitic diseases.

In the first place the prophylaxis therefore has to look towards an adequate disposal of the excreta, according to the circumstances, by means of the

installation of sewerage systems, septic pits or sanitary privies and, at any rate, by avoiding surface pollution of the soil and water courses. Then, the convenience of supplying the population with hygienic, not only chlorinated, but above all, filtered drinking water, is to be stressed. Even within the houses, the possible contamination of the water must be prevented, when, for reasons derived from its scarcity, this element must be stored in tubs and other domestic containers, as it happens in the North of Chile and in the poor populations of the slum areas.

Once a satisfactory sanitary environment is obtained it would be pertinent to face the possibility of treatment in mass of the carriers with the most efficacious drugs, available at the lowest costs.

Finally as regards to the prophylaxis, the sanitary education of the population is really transcendent and here the educational work of the physician plays an important part which, in our opinion, must not be waived. The medical attention to a sufferer from amebiasis should consist not only in a good diagnosis and adequate administration of the treatment (drugs and diet), but should also be supplemented by the study of the family group and by the respective medical and hygienic information which tends to modify those personal habits which are not suitable for the health of the individual and community.

The educational work of the physician and his immediate collaborators must not be limited to teaching the patient and his relatives what to do, in order to prevent the amebiasis, but also to urge them to solve by themselves their health problems, for which purpose an adequate knowledge of the environmental conditions which favor the transmission of the parasite, including the situations, caused by an unfavorable environment and from the acts and behaviour of the individual and the social groups, is indispensable.

The professional interested in the prophylaxis of this disease, will request this information from boards of health or will deduce them from an intelligent investigation of the patient and his family about the epidemiologic factors and about the related beliefs, superstitions, attitudes and hygienic practices. The orientation to be given to the educational action which he himself will develop in his consultations and which he will extend to his direct collaborators (nurses, auxiliaries, nuns at Hospital Services and others), will depend on the information which he receives. Surely, these instructions must be adapted to the cultural level and interests of the individual and his family group, and efforts must be made, in order to destroy the popular beliefs and superstitions which are related to the etiology of amebiasis and which may be sufficient to erect real psychologic barriers against the divulgation of the scientific knowledge. Justly, the physician's and his auxiliaries' understanding of these creads and the skill of associating them with the accepted knowledge of amebiasis and hygienic practices, will depend on the result of the education of the receiver.

The education may be extended to the home by means of visits of public health nurses, social workers, sanitarians and sanitary inspectors, who will emphasize the relations between the conditions of sanitation and amebiasis; they will stress the importance of the practices of personal hygiene and make demonstrations about the way of washing the hands, cleaning the vegetables and controlling the insects; finally, they will explain the reason why the coprologic examinations are extended to all the members of the family group. These educational tasks, applied to individuals or groups, may be intensified by adequate audio-visual materials, such as short letters, pamphlets, booklets, narrations and other graphic elements, as filmstrips and films.

On the other hand, we believe that each hospital or policlinic must supply the patient with means which enable him to deduce by himself the necessity or importance of good hygienic practices. We think that sufficient emphasis is never given in the hospitals as to importance of having well-equipped and satisfactorily maintained sanitary facilities, clean kitchens an a personal conscious of its responsibility for the hygienic preparation and serving of food to the patients and of giving practical lessons about these topics; to the careful control of insects and rodents; to the special care in washing the hands before eating and after defecating; and finally, to controlling the food which the relatives and visitors bring to the patient. In synthesis, if the hospitals represent real health centers, we feel that each of their dependencies, elements and personnel ought to be organized and orientated in the sense of offering demonstrations and examples of hygienic life to the community to which they serve. In order that this may become a reality, there is incumbent on the physicians the responsibility of the preparation and education of the auxiliary personnel working under their orders, so that, they may be enabled to accomplish satisfactorily their part in the education of the patients.

Furthermore, we have the conviction that the educational action, which may not be waived, is incumbent on the physician in the community, therefore, he may occupy himself with making known those factors which favor amebiasis, and with stimulating the public to fulfil their educational needs in this respect.

In this educational process, the primary school also has a primordial part; its educational action must train the child in the prevention of these diseases and to prevent their dissemination; in this sense, it is much more important to inculcate the epidemiologic knowledge and the preventive habits than the morphologic knowledge of the parasite. No doubt, the physician has a fertile field of action in enabling and stimulating the teachers to undertake these tasks.

Being a disease, for the prevalence and propagation of which man is primarily responsible, amebiasis may be considered as an illness derived from ignorance; hence the importance which we attach to the health education in the prophylaxis, for we are firmly convinced that every prophylactic work will be sterile without the existence of a collective conscientiousness about the responsibility

which is incumbent to each member of the community in the preservation of the health of the others, and without an individual behavior which eliminates those personal acts which facilitate the dissemination of the cysts of the protozoon.

SUMMARY

The authors report epidemiological studies on amebiasis in Chile, performed from 1949 to 1952. Surveys were obtained from parasitological examination of individuals of rural and suburban areas, selected at ramdon, and from patients who consulted for gastro intestinal symptoms at the Department of Parasitology. In the first step, one fecal examination was performed on 14.992 individuals of rural and suburban areas covering the whole length of the country (from Arica, 18° 5 latitude to Tierra del Fuego, 55° parallel, South). This study was completed in 4 years and showed a prevalence of 11,49 to 14,09% of amebiasis in the North Zone of the country (with exception of a 44% in Arica, which has a subtropical weather). In the Central Zones the frequency increased to approximately of 23,85%, and in the South, only 6,03% of the population was found infected.

These results may be explained by a poor environmental sanitation and by defective hygienic habits of the population. Actually, 65% of the individuals studied had the habit to defecate in the open field and 26% in privates located on streams eventually used for irrigation with water polluted with human stools. It must be emphasized that most of these vegetables are sent to cities and this might be an important factors in the epidemiology of amebiasis in Chile.

Direct investigations of the drinking and irrigating water are now in progress. Cysts morphologically similar to those of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* and eggs of *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* have already been found.

Entamoeba histolytica was found in 1624 of a total of 8494 gastrointestinal patients who consulted to the Department of Parasitology (19,12%). Emphasis is given to the importance of repeating the stools examination for a good diagnosis and to the necessity to make familiar inquiries with the purpose to find new cases and for a better appreciation of the epidemiological facts. Women were more often found infected than men (53,27% against 46,73%) and school age and young adults (under 30 years old) were more commonly infected (50% of all cases). Among children, the ages from 7 to 14 years were most affected.

Finally, the necessity for better sanitation, carriers treatment and especially health education are emphasized.

RIASSUNTO

Gli AA. riferiscono sui loro studi sulla amebiasi nel Cile compiuti dal 1949 al 1952. I dati furono ottenuti dall'esame parassitologico di individui di aree rurali e suburbane, scelti a caso, e da pazienti visitati per disturbi gastro-intestinali al Reparto di Parassitologia. Come prima indagine, si esaminarono le feci di 14.992 individui di aree rurali e suburbane sparse su tutto il Paese (da Arica, 18° 5 di latitudine, alla Terra del Fuoco, 55° parallelo, Sud). Questa ricerca fu completata entro 4 anni e mostrò una incidenza dell'amebiasi da 11,49% al 14,09% nella zona Nord del Paese (con la sola eccezione del 44% ad Arica, ove il clima è sub-tropicale). Nelle zone Centrali la frequenza si elevò approssimativamente a 23,85%, mentre nel Sud fu soltanto del 6,03%.

Questi risultati possono trovare una spiegazione nelle cattive condizioni sanitarie ambientali ed insufficienti abitudini igieniche della popolazione. Infatti, il 65% degli

individui sotto studio avevano l'abitudine di defecare all'aperto, ed il 26% usavano latrine che si scaricavano direttamente in acque usate all'occasione per irrigazione. Dato che la maggior parte della verdura coltivata è destinata alla città, si potrebbe individuare in ciò un importante fattore nella epidemiologia della amebiasi del Cile.

Sono presentemente in corso ricerche sulle acque di irrigazione e potabili. Sono state già repertate cisti morfologicamente simili a quelle di *E. histolytica*, *E. coli* ed uova di *H. nana*, *A. lumbricoides* e *T. trichiura*.

E. histolytica è stata repertata in 1.624 casi su di un totale di 8.494 pazienti (19,12%) con malattie gastro-intestinali, visitati al Reparto di Parassitologia. Viene sottolineata l'importanza di esami coprologici ripetuti ai fini di una diagnosi sicura, e la necessità di indagini famigliari per scoprire nuovi casi e per una migliore visione del quadro epidemiologico. Le donne sono state trovate infette (53,27%) più spesso che non gli uomini (46,73%); i giovani di età scolara e gli adulti sotto i 30 anni sono stati i più frequentemente infetti (50% del totale dei casi). Tra i bambini, le età più colpite sono risultate quelle fra i 7 ed i 14 anni.

Viene infine sottolineata la necessità di più severe pratiche igieniche, di una cura adeguata dei portatori ed, in modo particolare, di una educazione igienico-sanitaria della popolazione.

BIBLIOGRAPHY

1) Alessandri H. y Neghme, A. (1949): Consideraciones generales sobre las Enfermedades Parasitarias en Santiago, *Jornadas Clínicas de Verano «Fundación Lucas Sierra»*, *3*, 90-99.
2) Alessandri, H., Garcia, P. y Lerner J. (1949): Amibiasis intestinal. *Jornadas Clínicas de Verano «Fundación Lucas Sierra»*, *3*, 154-166.
3) Artigas, J. (1952): Nueva Técnoca de tinción para diagnóstico rutinario de protozoosis intestinales en el laboratorio. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*, 7, 12.
4) Artigas J. (1953): Hallazgo de *Entamoeba histolytica* en muestra de agua potable de Osorno. Nueva técnica de investigación. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*. *8*, 44.
5) Avendaño, O. (1938): Colitis ulcerosas, Santiago. *Ed. La Aurora*.
6) Cruz Coke, E. y Lira G. (1932): Estudio clínico de la disenteria en Chile. *Rev. méd. Chile*, *60*, 173-180.
7) Eyles, D. E., Jones, F. E. and Smith, C. S. (1953): A study of *Entamoeba histolytica* and other intestinal parasites in a rural West Tennessee Community. *Am. J. Trop. Med.*, *2*, 173-190.
8) Faust, E. C. (1930): The Endamoeba coli index of *E. histolytica* in a community. *Am. J. Trop. Med.*, *10*, 137-144.
9) Lerner, J. y Neghme, A. (1936): La importancia del estudio combinado simultáneo de la colitis por rectoscopía y coprología. *Rev. méd. Chile*, *64*, 781-791.
10) Neghme, A. (1936): Sobre cultivos de las amibas y diagnóstico de laboratorio de la amebiasis. *Bol. Soc. Biol. Concepción*, *10*, 85-91.
11) Neghme, A. (1936): Sobre cultivos de las amibas y amibiasis experimental. *Rev. méd. Chile*, *64*, 493-500.
12) Neghme, A. (1936): Consideraciones acerca de la disentería bacilar en el adulto *Rev. méd. Chile*, *64*, 734-737.
13) Neghme, A. (1936): El problema de la Amebiasis en Chile (comunicación al IX Congreso Cientifico de Chile). *Ed. Cultura*.
14) Neghme, A. y Gasic, G. (1937): Encuesta sobre amebiasis y otras enteroparasitosis en los conscriptos del Ejército de Chile (comunicación preliminar). *Rev. chilena hig.*, *1*, 46-48.
15) Neghme, A. (1938): La Amibiasis en Chile. Tesis de Prueba. Imp. *El Imparcial*. Santiago.
16) Neghme, A. (1938): Encuesta sobre amebiasis y otras enteroparasitosis en los

conscriptos de la III Guarnición Militar (Concepción II Comunicación). *Rev. chilena hig.*, *1*, 367-369.

17) NEGHME, A. (1938): La amebiasis y otras enteroparasitosis en los reclutas del Ejército de Chile. III Comunicación. *Rev. chilena hig.*, *1*, 370-371.

18) NEGHME, A. (1938): La amebiasis y otras enteroparasitosis en los conscriptos del Ejército chileno. IV Comunicación. Guarnición Militar de Arica. *Rev. chilena hig.*, *1*, 372-374.

19) NEGHME, A. (1938): La amebiasis y otras enteroparasitosis en los conscriptos del Ejército de Chile. V Comunicación. Guarnición Militar de Valparaíso. *Rev. chilena hig.*, *1*, 406.

20) NEGHME, A. (1939): Encuesta sobre amibiasis y otras enteroparasitosis en los conscriptos del Ejército de Chile. VI Comunicación. Guarnición de Antofagasta. *Rev. chilena hig.*, *2*, 65-66.

21) NEGHME, A. (1939): La amebiasis y otras enteroparasitosis en los conscriptos del Ejército de Chile. VII Comunicación. Guarnición Militar de Arica (2 a. encuesta) *Rev. chilena hig.*, *2*, 327-329.

22) NEGHME, A. (1939): Amebiasis in Chile. *Proccedings of the Sixth Pacific Science Congress*. Vol. V. Berkeley & Stanford. San Francisco. July 24 - August 12.

23) NEGHME, A. (1943): Aspecto epidemiológico de las parasitosis intestinales. *Rev. méd. Chile*, *71*, 211-222.

24) NEGHME, A. y MONTERO, E. (1945): Notas sobre el diagnóstico parasitario de las amebiasis. *Rev. méd Chile*, *73*, 1084-1085.

25) NEGHME, A. y SILVA, R. (1949): Epidemiologia de las parasitosis intestinales en el medio rural de Chile. *Jornadas Clínicas de Verano «Fundación Lucas Sierra»*, *3*, 8 - 22.

26) NEGHME, A. y SILVA, R. (1949): Epidemiología de las parasitosis intestinales en el medio rural de Chile. I Comunicación. *Rev. chilena hig.*, *11*, 17-23.

27) NEGHME, A. y SILVA, R. (1949): Epidemiología de las parasitosis intestinales en el medio rural de Chile. II Comunicación. Primeros resultados del censo enteroparasitológico en las provincias centrales. *Rev. chilena hig.*, *11*, 25-35.

28) NEGHME, A. y SILVA, R. (1949): Amebiasis en zonas rurales y sub-urbanes en la provincia de Santiago. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*, *4*, 51-52.

29) NEGHME, A. y SILVA, R. (1950): Nuevos estudios epidemiológicos de la amebiasis y otras enteroparasitosis en Chile. III Comunicación. *Rev. chilena hig.*, *12*, 87-94.

30) NEGHME, A. y SILVA, R. (1950): Etude épidemiologique de l'Amibiase et autres entero - parasitosis au Chili. *La Gazette Medicale de France*: 258-260.

31) NEGHME, A. y SILVA, R. (1951): Nueva contribución al estudio epidemiológico de la amibiasis y otras enteroparasitosis en Chile. *Rev. méd. Chile*, *79*, 449-457.

32) NEGHME, A. y SILVA, R. (1951): Nueva contribución al estudio epidemiológico de la amebiasis y otras enteroparasitosis en Chile (Resumen). *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*, *6*, 21-23.

33) NEGHME, A., SILVA, R. y ALVAREZ, M. (1952): Encuesta enteroparasitaria en el extremo austral de Chile. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*, *7*, 61-63.

34) NEGHME, A., SILVA, R. y ARTIGAS, J. (1952): Nuevos aspectos sobre epidemiologia de la amebiasis y enteroparasitosis. *Rev. chilena hig*, *14*, 243-257.

35) PRADO TAGLE, E. y AVENDAÑO, O. (1933-36): Colitis ulcerosas. *Arch. Clin. Med.* *3*, 14-27.

36) PRAT ECHAURREN, A. (1940): Formas no disentéricas de la amebiasis intestinal crónica. *Med. Moderna*, *14*, 253-263.

37) PINO, F. y CEA, O. (1952): Una experiencia sanitaria rural. I Programa de Saneamiento Ambiental del Distrito Sanitario de Pirque. *Rev. chilena hig.*, *14*, 161-166.

38) SAPERO, J. J. and LAWLESS, D. K. (1953): The «MIF» stain preservation technic for the identification of intestinal protozoa. *Am. J. Trop. Med.*, *2*, 613-619.

39) TOMPKINS, V. N. and MILLER, J. K. (1947): Staining intestinal protozoa with ironhematoxylin - phosphotungstic acid *Am. J. Clin. Path.*, *17*, 755-758.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

IMMUNOLOGY OF CHAGAS' DISEASE (*)

TULIO PIZZI, MAFALDA RUBIO and FELIZA KNIERIM (**) (***)

Information on the immunology of Chagas' disease has been, so far, insufficient and fragmentary. Most of the available data refers to serological aspects (1 - 5), and the few papers dealing with immunological mechanisms are incomplete or open to criticisms (6 - 17). This situation can be partly explained by technical difficulties in the study of *Trypanosoma cruzi,* such as the inaccuracy of most methods for adequate study of the parasitemia, the lack of standardized strains of the parasite, the absence of appropriate techniques for immunization, and the lack of standardized hosts.

The present paper deals with a series of experiments undertaken in the Department of Parasitology of the University of Chile after most of the foregoing difficulties had been overcome. The work covers a period of approximately 5 years. Part of the experiments have been published separately elsewhere (18 - 29) or will be communicated in detail in the near future. The present paper is an attempt to give a general review of the present status of our research. Therefore, the discussion will be centered more on the nature and significance of immunological mechanisms than on a detailed description of the experiments. It is hoped that this work will be the beginning of a systematic experimental approach on the immunological mechanisms of Chagas' disease.

Material and methods.

1. - *Strain of Trypanosoma cruzi.* — Most strains of *Trypanosoma cruzi* show irregular virulence and, therefore, are not adequate for comparative

---

(*) This research was initiated under the direction of the late Prof Giovanni Noè and was aided in part by a grant from Rockefeller Foundation to the University of Chile.

(**) *Department of Parasitology, Institute of Biology* « Juan Noé », *University of Chile.*

(***) The authors wish to express their appreciation to Professor William H. Taliaferro of the University of Chicago for his cooperation in some aspects of the work.

studies. However, it has been found in our laboratory that a strain of *T. cruzi* can be standardized to give uniform results ofter regular passages through an inbred strain of mice (18) (20). HAUSCHKA (30), working independently, arrived at a similar conclusion. In the experiments reported in this paper, a highly virulent strain (« Tulahuen » strain) was used. It was isolated in 1945 from the intestinal content of *Triatoma infestans* in the north of Chile and has been maintained since 1950 by serial passage every ten days in the very highly susceptible C3H inbred strain of mice (31, 32). When 100,000 or more parasites of this strain are inoculated intraperitoneally, all animals die in 10 to 12 days with 5,000 or more parasites per ml. in their peripheral blood. This strain has been referred to as « reticulotropic » (33, 34) since the parasites localize in the connective tissue cells to a greater extent than those of other strains. We have also isolated other strains with « normal » tissue tropism (« Huara » strain) and with marked «myotropic» preference («El Volcan» strain).

For inoculation, citrated blood was obtained by sacrificing the animals on the 10th day of infection, and the parasites were separated from erythrocytes by decantation and centrifugation.

The virulence of a strain of *Trypanosoma cruzi* can be easily depressed by continued passage in artificial culture medium. These low-virulent cultures may be used for immunizing animals by the method which will be described later.

2. - *Experimental host.* — Two species of host have been used in the experiments reported in this paper. One of them, represented by C3H mice (32), is characterized by its low degree of resistance against *T. cruzi*. The other one (rats of A-C strain) (*) has, on the contrary, a high degree of innate immunity and a marked ability to develop acquired immunity against this trypanosome. As age is an important factor in resistance to *T. cruzi*, two types of animals (either mice or rats) were used. Those below 2 months old will be referred to as « young animals », and older ones as « adult animals ».

All animals (either mice or rats) were of « inbred strains ». They have been kept for many generations by « brother-sister » mating. The genetic uniformity of the experimental host is very important in studying *T. cruzi*. Statistical analyses have been routinely applied to all experimental results.

Two methods of immunization have been used. In the first one, large numbers (80 to 600 millions) of culture forms, whose virulence had been depressed by long. continued transfer in artificial culture, were inoculated 2 or 3 times within 10 days. As later explained under these conditions, most of the crithidial stages, prevalent in these cultures, are readily phagocytized at the site of inoculation. Only a few slender trypanosome stages develop which

(*) This strain was obtained in 1950 from Alton Ochsner Medical Foundation and has been kept by « brother-sister » mating and genetic control in our Department.

give rise to a low grade infection. The animals thus treated develop a strong immunity against superinfection with virulent organisms. This method of immunization gives remarkably uniform results. The only necessary condition is to have made enough transfers in artificial media to secure a marked depression of virulence.. At present, we use cultures which have undergone 250 to 300 passages at the rate of one every 10 days in Senekjie's medium (35).

The second method consisted in inoculating virulent trypanosomes and simultaneously treating with a suppressive drug. Best results were obtained by using 0.25 mg daily of 8 - (4 amino - 1 methylbutylamino) - 6 methoxyquinoline (Primaquine). The effectiveness of this drug against *T. cruzi* infections was demonstrated by one of the authors (36). Here also, a low grade infection with a strong immunity against superinfection with virulent parasites is reached.

In addition, animals which have spontaneously recovered from an acute infection represent hosts with acquired immunity. Thus, A-C rats, which survive infection after two crises, show a strong resistence to super-infection and are adequate for the study of immunologic mechanisms. Experiments with this last type of host are still in progress and cannot be reported in this paper.

For testing immunity, large numbers (60-100 millions) of virulent parasites were inoculated 21 days after the initial immunization with low virulent culture forms or after the beginning of treatment with drugs. Thereafter, closely-spaced observations (every 1 or 2 hours) are imperative, as most of the parasites are rapidly destroyed in the immunized animals.

The ability to develop acquired immunity may be impaired by the early use of high doses of cortisone acetate (11-dehydro-17 hydroxycorticosterone-21 acetate) (22) (23). This aspect of the problem is still in progress in our Department.

To sum up, the present paper is based on an analysis of 90 experiments in which 4500 animals were used with the following types of hosts: a) Normal C3H mice and A-C rats of different ages; b) Animals artificially immunized with two different procedures (previous culture inoculation and drug-suppressive method); c) Cortisone-treated mice and rats.

3. - *Methods of evaluating the course of the infection.* — Besides the obvious means (death-rate in a series, weight-curve, clinical study), the course of the infection was studied by the three following procedures: a) parasitemia curves, b) serological study and c) histopathological study.

a) *Parasitemia curve.* The number of parasites in the peripheral blood is relatively so low during the greater part of the infection that most methods are not applicable to obtaining accurate parasitemia curves (5) (11) (37) (38). Fortunately, we developed a technique based on the examination of a large amount (5 cubic millimeters) of blood in a relatively short time. It involves the use of a specially graduated hemoglobin pipette and a plastic cover slip

ruled in squares (see details in ref. 24). Its accuracy has been repeatedly checked and found highly satisfactory. By this method the parasitemia has been ascertained daily (exceptionally every other day), and an average count made from an adequate number of animals.

b) *Serologic study.* Serum has been collected at different intervals and the following tests applied: (1) Precipitin test (« ring » method), using polysaccharide fractions of *T. cruzi* prepared according to MUNIZ technique (40) as antigen. (2) Agglutinin test according to SENEKJIE's (3) and HAUSCHKA et al's (4) procedure. (3) Complement fixation tests, using progressive serum dilutions for determinations of titer and lyophylized antigens according to PEDREIRA DE FREITAS and ALMEIDA (41). (4) Lysin test according to DENISON (2) with culture and blood stages. (5) Protective tests (curative and preventive). All these tests were accompanied by adequate controls.

c) *Histologic techniques.* For the study of the cellular aspects of immunity, closely spaced histologic preparations, adequately fixed and stained, are necessary. Only sacrificed (not spontaneously dead) animals were used (to avoid post-morten alterations). Tissues were fixed in Zenker-formol, embedded in celloidin and stained with Maximow's hematoxylin-eosin-azur II method (42). After the administration of the test dose in immunized animals, it is important to follow at frequent intervals the fate of the inoculated parasites. For this purpose, stretch preparations of connective tissue at the site of inoculation proved very useful. They were wet-fixed in Zenker-formol and stained with Maximow or Giemsa. In this type of preparation, cytological aspects (development of inflammatory macrophages, phagocytosis of parasites, etc.) can be easily followed. Also quantitative studies of the reproductive cycle of the parasite can be made, because they are easy to see and count in the extended host cell. This counting is obviously not possible in tissue sections.

Finally, direct observation under the phase contrast microscope of peritoneal fluid obtained at closely spaced intervals or kept in «wet chambers» was very valuable for studying phagocytosis directly after inoculation of the test dose. This process was followed in some experiments for 18 consecutive hours.

EXPERIMENTAL RESULTS.

1. *Normal* C3H *mice inoculated with virulent blood stages of* T. cruzi.

When 100,000 or more virulent parasites are inoculated in young C3H mice, very uniform results are obtained (24) (29). After a few hours, a moderate number of parasites appear in the blood (generally less than 100 per cmm.). They remain at about the same level for 3 to 6 days, when a sharp increase of the parasitemia appears. Thereafter, the number of parasites in the peripheral blood steadily increases, reaching 5,000 or more trypanosomes per ml by the 10th to the 12th day when death occurs. The histologic study

has shown that most of the inoculated parasites invade the connective tissue cells at the site of inoculation within the first 8 hours, transform into leishmaniastages and start reproduction at an approximate rate of 1 binary division every 12 hours (fig. 1). From the 3rd to the 6th day, most of the parasites complete their first reproductive cycle at the point of inoculation and transform again into trypanosome-stages, most of them of the « slender » type. Leaving the cell, which is destroyed, they invade the blood. The parasites localize again in cells of different tissues (mainly in the connective tissue cells and muscle fibers), but this invasion occurs at variable intervals. Therefore, the more or less synchronous development that was encountered at the site of inoculation is lost.

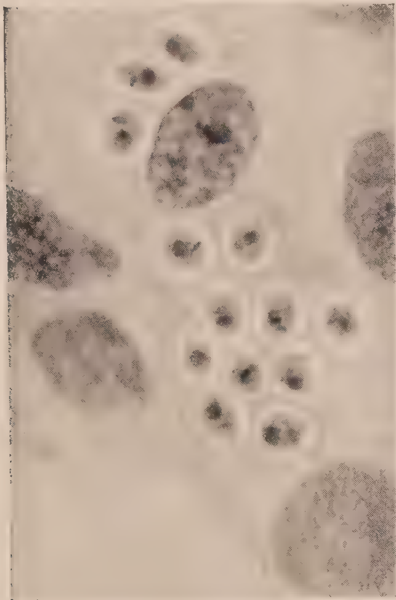


Fig. 1. — Normal development of leishmania-stages of *T. cruzi* in histiocyte of C3H mouse.

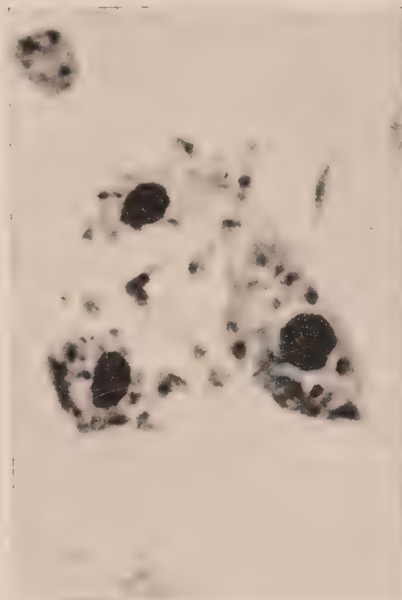


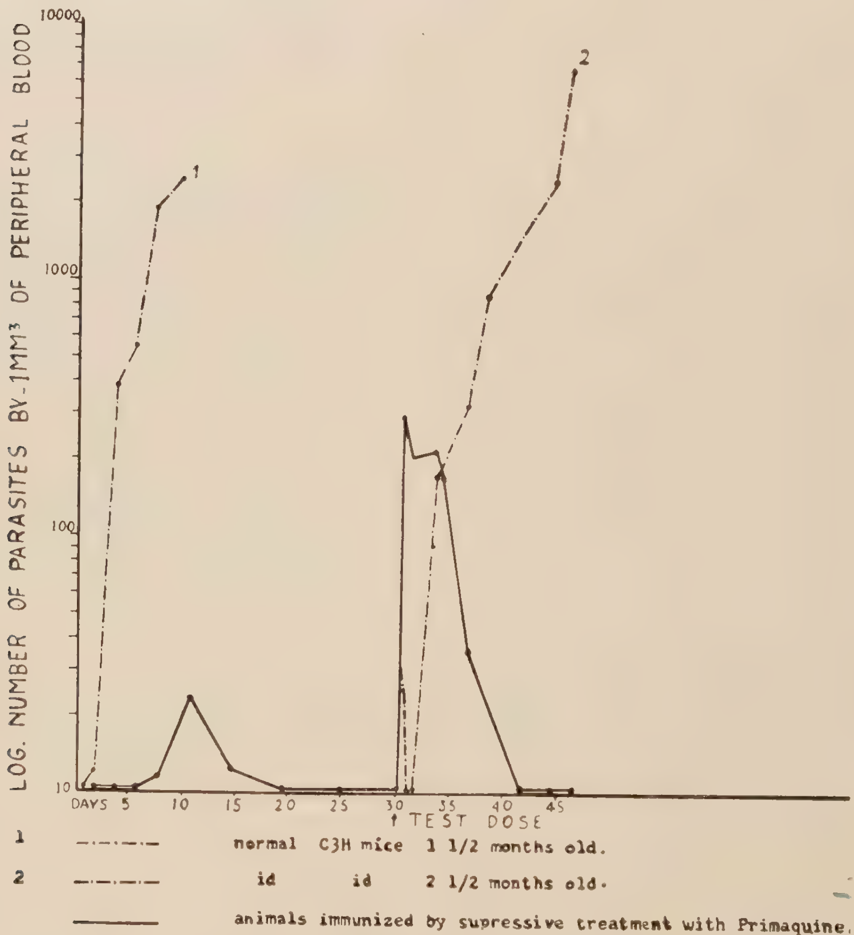
Fig. 2. — Phagocytosis of low-virulent cultures of *T. cruzi* in normal C3H mice.

Inflammation is mild and late in these animals. Some cellular infiltration may be observed around parasitic accumulations in different tissues, but usually no important inflammatory reaction is found. At times, damaged parasites are observed inside macrophages, but for the most part rapidly dividing leishmania stages of normal appearance occur throughout the tissues.

In lymphatic organs, however, marked changes are characterized by a depletion of small lymphocytes, an increase in the number of medium and large lymphocytes in the nodules of the spleen and important myeloid activity

in the splenic red pulp. Later, marked degenerative changes are observed in the spleen and lymph nodes (lymphorrhexis). Death seems to occur by the time most of the parasites complete their second reproductive cycle. Cell destruction and the overwhelming number of new parasites produced may cause death of the host.

No antibodies are found during the whole development of the infection under the above experimental conditions.



Graph 1. — Parasitemia curves of normal and immunized C3H mice inoculated with T. cruzi.

The foregoing facts, clearly show that young C3H mice are hosts that have a very low grade of innate immunity and are unable to develop any efficient acquired resistance to virulent stages of *T. cruzi*. Reproduction of the parasites occurs unimpaired in most cells, no important inflammatory reaction is elicited

and antibodies are not formed in any demonstrable amount. The marked changes in the lymphatic organs are not clarly explained. As a whole they are ineffective as a defensive mechanism. It is probable that they may represent part of SELYES «alarm reaction» (43) (44) (45).

In adult mice, much the same general phenomena occur, but the animals survive longer. Finally, the dose and the route of inoculation have some effect on the duration of the prepatent period and on the intensity of the resulting infection, but not on the survival time.

2. *Normal* C3H *mice inoculated with low-virulent cultures.*

A completely different picture occurs when C3H mice are inoculated with low-virulent colture forms. A marked inflammatory reaction with abundant heterophils (*) appears at the site of inoculation. Most parasites are quickly ingested by macrophages and rapidly destroyed (fig. 2). Only a few slender trypanosome stages escape phagocytosis and develop: they give rise to a mild and transient infection (see details in ref. 21). The initial inflammation reaches its maximum about the 3rd day and decreases thereafter, but many active macrophages remain after the 10th day and are active in destroying virulent parasites when reinfection occurs. Changes in the lymphatic organs are similar in nature to those found in the previous section, but are considerably milder. Degenerative changes are absent.

Contrary to what happened in the mouse receiving virulent organisms, antibodies appear 6 days after inoculation and increase thereafter until about the 14th day. Afterwards, the antibody titers steadily decrease with an apparent «half life» of about 6 days until the 26th day. From them on, the primary decline is followed but a much slower rate of decrease.

3. *Effect of suppressive treatment with primaquine on virulent infections of* C3H *mice.*

In animals receiving primaquine treatment, the development of parasites is markedly retarded, more inflammation is produced and phagocytic activity is much more prominent than in non-treated animals. As a consequence, a low grade infection is obtained with a strong immunity against superinfection. It is noteworthy that in contrast to what was found in animals immunized by low-virulent cultures, no antibodies are observed.

4. *Effect of challenge with virulent parasites in immunized* C3H *mice.*

When a large dose of virulent blood stages of *T. cruzi* is given to immunized animals, essentially the same phenomena occur in both the previously culture-

---

(*) We have adopted the nomenclature followed by MAXIMOW-BLOOM (46) and TALIAFERRO (47) for designating cells involved in immune reactions.

inoculated and in the primaquine-treated mice. Most of the inoculated parasites are very rapidly destroyed by phagocytosis at the site of inoculation (fig. 3). When the injection is performed in the same place used for immunization, a great number of macrophages are already available from the previous stimulation. They become very active and ingest many parasites within the first 2 to 6 hours. Inflammation is also much more intense than in the non-immunized

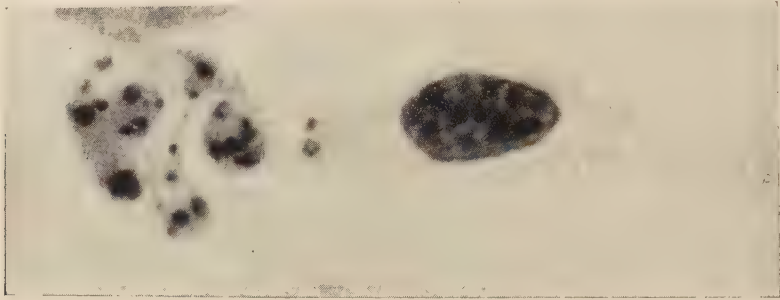


Fig. 3. — Phagocytosis of *T. cruzi* in histiocytes of an immunized CH3 mouse.

animals. The cellular infiltration mainly consists of lymphoid and polyblastic cells. A large number of new inflammatory macrophages are locally formed by the heteroplastic development from lymphoid and monocytoid cells. Phagocytosis is almost completed by 24 hours at which time only cellular debris remains. When the injection of the test dose is performed in a different site from that used for immunization, a marked inflammatory reaction is also elicited, and many macrophages are rapidly formed by the mobilization and division of local fixed histiocytes as well as by the heteroplastic development of macrophages from hematogenous mononuclear cells. Only a few parasites escape phagocytosis and a mild infection develops which permits survival of the animals.

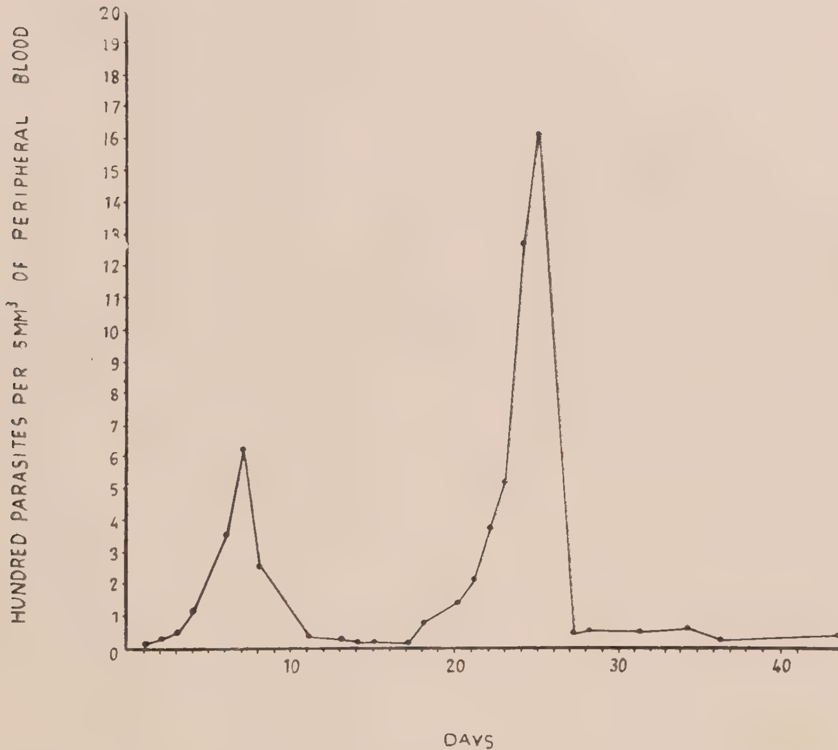
The effect of the test dose on the lymphatic organs is manifested by marked enlargement of the spleen and lymph nodes. The main histologic changes are a marked increase in the splenic red pulp and the presence of many plasma-cells in the lymph nodes.

Finally, the decline of the antibody titer, observed in animals immunized with cultures, is suppressed after the inoculation of the test dose and the titers remain for several weeks at about the same level.

5. *Normal A-C rats inoculated with virulent parasites.*

Two types of parasitemia curves are obtained according to the age of the rat. In young rats, from the 3rd to the 8th day, the number of parasites in the peripheral blood increases, and a parasitic crisis ensues (see graph 2).

After a few days, a new increase is observed, which reaches its maximum about the 20th day and is again followed by a crisis. Afterwards, the animals survive



Graph 2. — Parasitemia of A/C rats inoculated with virulent blood stages of *T. cruzi* (data based on daily averages).

and show occasional parasites in the blood. Although the level of the parasitemia may be variable, this sequence of rises and falls in the parasitemia is fairly constant and occurs in at least 80% of the animals. In some cases, however, only one rise and crisis or an irregular parasitemia curve are observed.

The histologic study shows that the main defensive mechanism is again associated with phagocytosis, which occurs especially during the second crisis in the connective tissue of different organs. It is to be noted that antibodies markedly increase during the crisis and also that damaged parasites are observed at these times outside the cells. It is possible, therefore, that lytic as well as opsonic factors may be functional in defense and may contribute to the rapid fall of the parasitemia observed during the crisis. Nevertheless, no typical lysin, such as described in other trypanosome infections, was found in our animals. On the other hand, phagocytosis undoubtedly ultimately destroys the parasites. The cells which participate in the digestion of the parasites are

again macrophages, most of them apparently arising heteroplastically. Often they appear in inflammatory exudates which frequently occur during the crisis in the heart and in other organs.

In lymphatic tissues, changes similar but less marked than in normal C3H mice (vide supra) occur, but lymphorrhexis is pratically non-existent.

It is noteworthy that often after the second crisis when parasites are very scarse, a diffuse myocarditis may appear. It is characterized by an infiltration of lymphoid and monocytoid cells and a few heterophils without topographic relationship to parasitic foci. This myocarditis is, therefore, similar to that encountered in human cases (48) (49) (50). It is probable that this type of reaction may be associated with hypersensitivity (see refs. 16 and 17).

In old rats, only a low grade parasitemia is observed from the beginning and no crisis appears. The difference in old as contrasted to young rats is explained by the marked phagocytosis which occurs in the site of inoculation. Thus while marked destruction of the parasites occurs in young animals only during the crisis, phagocytosis is immediately evident in old rats and prevents most of the parasites from developing.

6. *Effect of cortisone-treatment on experimental* T. cruzi *infections.*

The action of cortisone on experimental *T. cruzi* infections seems to depend on such factors as the species of host, dose used and time of administration. Large doses given early clearly increase the intensity of the infection. The effect is more marked in mice than in rats. Smaller doses within the physiological range, however, fail to intensify the course of the infection and seem at times to be beneficial (22) (23).

The mechanisms by which cortisone depresses immunity to *T. cruzi* are still under investigation in our Department. So far, there is good evidence that the action is due to damage to the main cellular mechanism of acquired immunity, that is, to an impairment of the formation of new inflammatory macrophages which are functional in destroying parasites. It is to be noted that SCHMIDT and SQUIRES (51), working in malarial infections, arrived at similar conclusions.

DISCUSSION.

The main defensive mechanisms in most trypanosome infections have been found to be humoral (see reviews in refs. 52, 53). Many authors have described phagocytosis against different trypanosomes but, in general, this action has been interpreted as a secondary phenomenon (52) (53). In Chagas' disease, most authors have stressed that the parasite is able to develop in phagocytic cells and, therefore, it has been inferred that phagocytosis and digestion must not be a mechanism of defense (54) (55) (56).

Our research has clearly shown that the digestion of parasites in macro-

phages is the main defensive mechanism and that the behavior of connective tissue cells involved in defense is different in the immunized and in the normal host. The failure of previous workers to demonstrate the importance of cellular activity in the destruction of *T. cruzi* may be explained by inadequate techniques. In fact, phagocytosis occurs so rapidly that closely spaced observations and good histologic techniques are necessary to follow the whole process. Most of the theories on the pathogenicity of *T. cruzi* have been based on observations from autopsies of human cases (cf 55 and 56) (which obviously are not adequate for the study of immunological mechanisms) or in incomplete studies of experimental animals using non-standardized strains of parasites, hosts of different genetic constitution and scattered histological observations.

It is not clear to what extent humoral factors may cooperate in defense. In general, antibodies are associated with resistance, as is shown in mice immunized with low-virulent cultures and in the increased titers observed in rats during the crisis. Similarly, the rapid disappearance of parasites from the blood of rats suggests the presence of a lysin. Nevertheless, this antibody has not been demonstrated by currently used techniques.

The inability to demonstrate any lytic activity at times, as in mice immunized by suppresive treatment with primaquine, and the general participation of macrophages in defense, with the probable cooperation of opsonic antibodies, suggest that the immunological mechanisms of Chagas' disease are similar to those observed in malaria (57) (58). Nevertheless, in *T. cruzi* infections, the spleen is not an important site of parasitic destruction, as in *Plasmodium* infections: the phagocytic activity occurs mostly in inflammatory macrophages in the connective tissue of different organs. These facts emphasize the local character of many general immunities and the limitation of phagocytic activity to strategically placed macrophages as pointed out by TALIAFERRO (59).

It is clear that the presence of *T. cruzi* inside of macrophages represents two different phenomena from an immunological point of view. At times, the cell may simply be the site of unimpaired multiplication of leishmania stages. At other times the cell may actively digest the parasites.

Parasitic destruction is always associated with an increased inflammatory reaction, and the macrophages of focal infiltrations seem to be the most active ones. Mention should be made of a diffuse inflammatory reaction in some animals after the acute stage of the disease has subsided. It is mainly observed in the hearts of A-C rats and in mice immunized with primaquine. This inflammation may be explained as a hypersensitivity mechanism, as has been shown by other authors (16) (17).

To sum up, we believe that for the correct interpretation of the pathogenic and immunological aspects of Chagas disease, the following aspects should be considered:

1. - The multiplication of the parasite in host cells.

2. - The actual phagocytosis (and digestion) of the parasites which occurs mainly in inflammatory macrophages. This action is associated with focal inflammatory reactions and represents a defensive mechanism. It is probably assisted by non-lytic antibodies.

3. - The production of diffuse and late inflammatory reactions without topographic relationship to the parasite foci which probably represents a hypersensitivity reaction.

The predominance of one or more of these aspects depends on the immunological condition of the host. The following possibilities may be distinguished:

a) In a host with a low grade immunity and a limited ability to develop acquired immunity (C3H mice), point 1 of the above classification will predominate.

b) In a host with a higher degree of innate immunity and a marked ability to develop acquired immunity (young A-C rats), phagocytosis of the parasites occurs under the conditions outlined in point 2 and is evident in different organs during the crisis. Inflammation of the type outlined in point three may also appear during later stages.

c) In a host with a high grade acquired immunity (immunized animals), phagocytic activity as in b above is the main mechanism of defense (point 2) but here the action is evident from the time the challenge dose is given and occurs at the site of inoculation.

d) In a host in which a strong innate immunity is evident (old rats when inoculated with virulent blood-stages or C3H mice inoculated with low virulent cultures), most parasites are destroyed at the site of inoculation.

SUMMARY

1. - Mice of the C3H strain have a low degree of resistance against the inoculation of virulent forms of *T. cruzi*. All the animals die in 10 to 12 days. Parasites multiply very actively in fibroblasts, fixed macrophages and muscle fibers. There is a mild and late inflammatory reaction and a low degree of phagocytosis. Antibodies are not found during the course of the infection.

2. - Homozygous rats of the A-C strain manifest a high degree of resistance against *T. cruzi*, as shown by parasitic crises and recovery from the acute stage of the disease. Later, the animals retain a low grade infection and develop a strong immunity to superinfection. Phagocytosis is important during the crisis and occurs in macrophages of inflammatory foci. At the same time there is an increase in antibody titer. Rats more than 100 days old have a marked innate immunity (increased by age) which manifests itself by phagocytosis and destruction of most parasites at the site of inoculation.

3. - Low virulence culture forms of *T. cruzi* are readily destroyed at the site of inoculation even in a nonimmunized host. Only a few slender trypanosome stages develop. These give rise to a low grade infection and a strong immunity against virulent parasites.

4. - Phagocytosis by inflammatory macrophages seems to be one of the main defensive mechanisms agaist *T. cruzi*. However, phagocytosis may sometimes be assisted by humoral factors acting on the parasites.

5. - From the histopathological point of view, two different aspects should be sharply separated in *T. cruzi* infections: 1) the invasion of fixed macrophages by the parasite and its subsequent multiplication and 2) the actual phagocytosis with destruction of the parasite by inflammatory macrophages.

6. - Inflammation in Chagas' disease at times may represent a defensive phenomenon (phagocytosis in inflammatory foci) and at other times may be the consequence of hypersensitivity due to infection (diffuse interstitial inflammation).

7. - Cortisone depresses immunity against *T. cruzi* provided it is given early and in large amounts.

RIASSUNTO

1. - Topini del ceppo C3H hanno un basso grado di resistenza verso l'inoculazione di forme virulente di *T. cruzi*. Tutti gli animali muoiono entro 10-12 giorni. I parassiti si moltiplicano molto attivamente nei fibroblasti, nei macrofagi fissi e nelle fibre muscolari. Vi è una modica e tardiva reazione infiammatoria ed un basso grado di fagocitosi. Nel corso dell'infezione non si trovano anticorpi.

2. - Ratti omozigoti del ceppo A-C mostrano un alto grado di resistenza verso *T. cruzi*, come lo dimostrano le crisi parassitarie e la guarigione dello stadio acuto della malattia. In seguito, gli animali mantengono un basso grado di infezione e sviluppano una forte immunità alla superinfezione. La fagocitosi è importante durante la crisi ed avviene nei macrofagi dei focolai infiammatori. Allo stesso tempo vi è un aumento del titolo di anticorpi. Ratti di più di 100 giorni hanno una spiccata immunità congenita (che aumenta con l'età) che si manifesta con fagocitosi e distruzione della maggior parte dei parassiti al punto d'inoculazione.

3. - Forme di coltura di *T. cruzi* a bassa virulenza vengono prontamente distrutte al punto d'inoculazione anche nel caso di un ospite non immunizzato. Solo pochi, sottili elementi allo stadio di tripanosomi riescono a svilupparsi. Questi danno origine ad un basso grado di infezione ed a una forte immunità verso parassiti virulenti.

4. - La fagocitosi da parte di macrofagi infiammatori sembra essere uno dei principali meccanismi difensivi verso *T. cruzi*. Tuttavia, la fagocitosi può essere alcune volte favorita da fattori umorali che agiscono nei parassiti.

5. - Dal punto di vista istopatologico, si dovrebbero separare decisamente due aspetti differenti nella infezione da *T. cruzi*: 1) l'invasione di macrofagi fissi da parte del parassita e la sua conseguente moltiplicazione, 2) la vera fagocitosi con distruzione del parassita da parte di macrofagi infiammatori.

6. - L'infiammazione, nella malattia di Chagas, può a volte rappresentare un fenomeno difensivo (fagocitosi in focolai infiammatori) ed altre volte può essere la conseguenza di ipersensibilità dovuta all'infezione (infiammazione interstiziale diffusa).

7. - Il cortisone diminuisce l'immunità verso *T. cruzi* se somministrato precocemente ed a forti dosi.

BIBLIOGRAPHY

1) Kolodny, M. H. (1939): The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am. J. Hyg.* (*Sect. C.*), *30*, 19-39

2) Denison, N. (1943): Immunologic Studies in Experimental *Trypanosoma cruzi*

Infections. 1. Lysins in Blood of Infected Rats. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, *52*, 26-27.

3) SENEKJIE, H. A. (1943): Immunologic Studies in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections: 2. Slide Agglutination and Intradermal test. *Proc. Soc. Exper Biol. & Med.*, *52*, 5659.

4) HAUSCHKA, TH. S., GOODWIN, M. B., PALMQUIST, J. and BROWN, E. (1950): Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 1-16.

5) KOLODNY, M. H. (1940): Studies on age resistance against trypanosome infections. VII. The influence of age upon immunological response of rats to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Hyg.* (*Sect. C.*), *31*, 1-8.

6) BRUMPT, E. (1913): Immunité partielle dans les infections a *Tripanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*. Role regulateur des hotes intermediaires. Passage a travers la peau. *Bull. Soc. path. exot.* *6*, 172-176.

7) COLLIER W. (1931): Uber Immunität bei der Chagas-krankheit der weissen Mauss. *Ztschr. Hyg.*, *112*, 88-92.

8) GALLIARD, (1930): Infections a *Trypanosoma cruzi* chez les animaux splenectomisés. *Bull. Soc. path. exot*, *23*, 188-192.

9) DIAS, E. (1934): Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *28*, 1-110.

10) WOOD, F. D. (1934): Natural and experimental infection of *Triatoma protracta* Uhler and mammals in California with American human trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med.*, *14*, 497-517.

11) CULBERTSON, J. T. and KOLODNY, M. H. (1938): Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi.*, *J. Parasitol.*, *24*, 83-90.

12) DENISON, N. (1943): Experimental studies on *Trypanosoma cruzi* infection and reticulo-endothelial blockade in rats. *Am. J. Hyg.* *38*, 178-184.

13) MUNIZ, J., NOBREGA, G. e DA CUNHA, M. (1946): Ensaios de vacinacao preventiva e curativa nas infeccoes pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Osw. Cruz.*, *44*, 529-541.

14) REGENDANZ, P. (1930): Der Verlauf der Infektion mit *Schizotrypanum cruzi* (Chagas) bei jungen Ratten und über die Unempfänglichkeit erwachsener Ratten für *Schizotrypanum*. *Zentralbl.* (*Arb.* 1), *116*, 256-264.

15) HAUSCHKA, TH. S. (1947): Sex of host as a factor in Chagas' disease. *J. Parasitol.*, *33*, 399-404.

16) MUNIZ, J. e PENNA DE AZEVEDO, A. (1947): Novo conceito da patogenia da «doenca de Chagas» (trypanosomiasis americana). Inflamacao alérgica granulomatóide (A), e miocardite hiperérgica (B), produzidas em «Rhesus» (*Macaca mulatta*) inoculados con formas mortas de cultivo do *Schizotrypanum cruzi* (nota previa). *Hospital, Rio de Janeiro*, *32*, 165-183.

17) MUNIZ, J. e PENNA DE AZEVEDO, A. (1950): Novo conceito da patogenia da Doenca de Chagas. (Trypanosomiasis americana). Transmissao passiva do estado alérgico provocado por inoculacao de antígeno de *Schizotrypanum cruzi*. Primera Reunión Panamericana sobre la Enfermedad de Chagas y Primera Reunión conjunta de la Sociedad Argentina.

18) PIZZI, T., AGOSIN, M., CHRISTEN, R., HOECKER, G. y NEGHME, A. (1949): Estudios sobre inmunobiología de las enfermedades parasitarias: I. Influencia de la constitución genética en la resistencia de las lauchas a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas*, *4*, 48-49.

19) PIZZI, T., AGOSIN, M., CHRISTEN, R., HOSCKER, G. y NEGHME, A. (1948): Influencia de la constitución genética de la laucha en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biológica*, *8-11*, 43-53.

20) PIZZI, T., AGOSIN, M., CHRISTEN, R., HOECKER, G. y NEGHME, A. (1949): Estudios sobre inmunobiología de las enfermedades parasitarias. I. Influencia de la con-

stitución genetica en la resistenci de las lauchas a la infectión experimental por *Trypanosoma cruzi. Rev. Soc. mex. hist. nat., 10*, 113-119.

21) Pizzi, T. y Pragfr, R. (1952): Immunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas, 7*, 20-21.

22) Pizzi, T., Rubio, M., Prager, R. y Silva, R. (1952): Acción de la cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi. Bol. Inf. Parasit. Chilenas, 7*, 22-24.

23) Pizzi, T. (1952): Cortisona en las enfermedades protozoarias. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas, 7*, 25-27.

24) Pizzi, T. y Prager, R. (1952): Estabilización de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitución genética uniforme; analisis cuantitativo del curso de la infección. *Biológica, 16-17*, 3-9.

25) Pizzi, T. (1953): Sobre el problema de las formas delgadas de *Trypanosoma cruzi. Bol. Inf. Parasit. Chilenas, 8*, 26-30.

26) Rubio, M. (1953): Contribución al estudio de la enfermedad de Chagas. XII. Inmunología de la enfermedad de Chagas experimental de la rata. *Tesis. Universidad de Chile.*

27 Pizzi T., Rubio, M. y Knierim, F. (1953): Contribución al conocimento de los mecanismos inmunitarios en la enfermedad de Chagas experimental de la rata. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas, 8*, 66-72.

28) Knierim, F. (1954): Estudio serológico en animales experimentalmente infectados por *Trypanosoma cruzi. Bol. chileno Parasit., 9*, 2-6.

29) Pizzi, T., Rubio, M. y Knierim, F. (1954): Immunologia de la enfermedad de Chagas. *Bol. chileno Parasit., 9*, 35-47.

30) Hauschka, Th. S. (1949): Persistence of strain specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *J. Parasitol., 35*, 593-599.

31) Law, L. W. (1948): Mouse genetic News. *J. Hered., 39*, 300-308.

32) Committee on standardized nomenclature for inbred strains of mice. (1952): Standardized nomenclature for inbred strains of Mice. *Cancer Res., 12*, 602-613.

33) Badinez, O. (1945): Contribución a la Anatomía Patológica de la enfermedad de Chagas experimental. *Biológica, 3*, 3-20.

34) Pizzi, T. (1945): Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas experimental. *Biológica, 3*, 53-59.

35) Senekjie, H. A. (1943): Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med., 23*, 523-531.

36) Pizzi, T. (1951): Effect of Primaquine on Experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 78*, 643-644.

37) Goble, F. C. (1949): Observations on experimental Chagas' disease in dogs. *Am. J. Trop. Med. and Hyg., 1*, 189-204.

38) Sonntag, R. e Kloetzel, J. (1953): Tratamento da infecção experimental de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi* com achromicina. *Folia Clin et Biol., 20*, 113-138.

39) Pereira da Silva, L. H. e Nussenzweig, V. (1953): Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin et Biol., 20*, 191-208.

40) Muniz, J. (1947): Do valor da reacao de precipitina no diagnóstico das formas agudas e sub-agudas da «Doenca de Chagas» («Trypanosomiasis americana») *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 45*, 537-549.

41) Pedreira de Freitas, J. L. e Almeida, J. O. (1949): Nova técnica de fixacao do complemento para molestia de Chagas. *Hospital, Río de Janeiro, 35*, 787-800.

42) Lillie R. D. (1948): Histopathologic Technic. The Blakiston Company, Philadelphia, (pag. 81 Maximow's Hematoxylinazur II eosine).

43) SELYE, H. (1950): The Physiology and Pathology of exposure to stress. Acta Inc., Montreal.

44) SELYE, H. and HALL, C. S. (1943): Pathological changes induced in various species by overdosage with desoxycorticosterone. *Arch. Path.*, *36*, 19-31.

45) EHRICH, W. E. and SEIFTER, J. (1953): The effect of corticosteroids upon lymphoid tissue. *Symposium New York Academy of Medicine Section on Microbiology, 6.*

46) MAXIMOW, A. A. and BLOOM, W. (1950): Textbook of Histology, 5th edition. W. B. Saunders Co., Philadelphia.

47) TALIAFERRO, W. H. (1949): The cellular basis of immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, *3*, 159-194.

48) CHAGAS, C., VILELLA, E. and DA ROCHA LIMA, H. (1929): Amerikanische Trypanosomenkrankheit. Chagas-Krankheit, in MENSE, C., Handbuch der Tropenkrankheiten, *3*, 673-728.

49) MAZZA, S., JORG, M. E. y CANAL FEIJOO, E. J. (1938): Primer caso crónico mortal de forma cardíaca de enfermedad de Chagas demostrado en Santiago del Estero. M.E.P.R.A., pub. 38, Buenos Aires.

50) TORRES, C. M. e DUARTE, E. (1948): Miocardite na forma aguda da doenca de Chagas. *Mem. Inst. Osw. Cruz.*, *46*, 759-793.

51) SCHMIDT, L. H. and SQUIRES, W. L. (1950): The influence of cortisone on primate malaria. *J. Exper. Med.*, *94*, 501-520.

52) TALIAFERRO, W. H. (1929): The Immunology of Parasitic infections. The Century Co. New York.

53) PENSO, G. (1938): I fenomeni immunitari nelle tripanosomiasi. *Rendiconti dell'Istituto di Sanità pubblica, 1*, 931-1078.

54) DIAS, E. (1932): Le *Trypanosoma cruzi* et ses rapports avec le systeme reticulo-endotelial. *Comptes rendus de la Societe de Biologie, 110*, 206-210.

55) MAZZA, S. and JORG, M. E. (1935): Consideraciones sobre la patogenia de la enfermedad de Chagas. *Novena reunión de la Soc. Argentina de Pat. regional, 1*, 222-231.

56) MAZZA, S. (1951): Chagas' disease, in Gradwohl's Clinical Tropical Medicine. Mosby, St Louis.

57) TALIAFERRO, W. H. and MULLIGAN, H. W. (1937): The histopathology of Malaria with special reference to function and origin of the macrophages in defence. *Indian M. Res. Mem.*, *29*, 1-138.

58) TALIAFERRO W. H. (1949): Immunity to the Malaria Infections, in « Malariology », edited by M. F. BOYD, ed. I, Philadelphia, Saunders, Vol. 2, Chapter 39, p. 935-965.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

THREE NEW SPECIES OF FUR MITES (*ACARINA: LISTROPHORIDAE*) (*)

CHARLES D. RADFORD

Introduction.

The present paper is submitted as a small contribution to the commemorative volume in honour of the memory of Prof. B. Grassi the eminent zoologist.

Pagenstecher (1861) established the genus *Listrophorus* for a new species of mite which had been taken in the fur of a vole (*Microtus a. arvalis* Pallas, 1778) making the type of the genus *Listrophorus leuckarti*. In this genus the pedipals are modified to form grasping organs with which the mite can retain a firm hold on the fur of the host. The legs are all normal, terminated by a tarsal sucker and without modifications for hair grasping.

To date some nineteen species have been described, all being parasitic on small mammals.

The genus *Listrophoroides* was established by Hirst (1923) to accommodate a mite taken on the pouched mouse (*Cricetomys g. gambianus* Waterhouse, 1840) making the type of the genus *Listrophoroides aethiopicus*. The distinguishing character of this genus is the tarsal joints of legs I and II which are modified to form grasping organs for attachment to the hair of the host; legs III and IV are simple, and terminated by a tarsal sucker. To date there are eight species in this genus.

G. Canestrini (1892) established the family *Listrophoridae* for the fur mites of the genera *Listrophorus* Pagenstecher, 1861 and *Myocoptes* Claparede, 1869 (= *Criniscansor* Poppe, 1887).

Gunther (1942) in a revision of the *Listrophoridae* established the sub-families *Mycoptinae*, *Atopomelinae* and *Labidocarpinae*. He placed *Listrophoroides* in the sub-family *Atopomelinae*.

(*) This work has been made possible by a grant from the Nuffield Foundation. London.

In the present paper the author has described three new species of these interesting little mites. In a tube of mites taken from a mouse (*Oryzomys p. palustris* (Harlan, 1837)) there were numbers of two distinct species which are herein named respectively *Listrophorus grassii* n. sp. and *Listrophoroides oryzomys* n. sp. The third mite taken on a gerbil (*Meriones l. libycus* Lichtenstein, 1823) is named *Listrophorus theodori* n. sp.

The mites from the first host were sent for identification by Harvey B. Morlan, Senior Sanitarian, U. S. Public Health Service, Santa Fe, New Mexico U.S.A. along with other mites previously identified. The mites from the second host were sent by Prof. O. Theodor, Hebrew University, Jerusalem, State of Israel in whose honour the species is named. The author wishes to express his thanks to the above named scientists for having provided this material.

The allotype and holotype slides are in the author's private collection Paratypes will, where the number of specimens permit, be distributed to colleagues working in these groups.

Family LISTROPHORIDAE Canestrini, 1862
Genus LISTROPHORUS Pagenstecher, 1861

Listrophorus grassii n. sp.

Body elongate, parallel-sided, the anterior and posterior ends rounded; in general appearance closely similar to other species of the genus; differing from these in the terminal half of the body, larger size, and stoutness of legs III and IV.

The male venter (Fig. 1) shows the posterior half of the body. Anterior to leg III there is a chitinized shield on which there are no setae; a broad chitinized shield extends from leg III to leg IV closer to the lateral edge of the body. All legs are borne on the venter, not on lateral edge of body; leg I long and slender; legs II and III shorter than the others; legs III and IV stouter than I and II all legs terminated by a tarsal sucker; chaetotaxy sparse.

Between and posterior to legs III is the genital pore; anterior to the pore there is a heavily chitinized, horse-shoe shaped platelet on whichthere is a pair of long, stout spines.

The anal suckers are large, with chitinized bars radiating like the spokes of a wheel. On the posterior tip of the body there is a deep indentation medially; on each caudal lobe there are three spines, the median spine being longer and stouter than the others, the inner pair of spines being short and slender. At the lateral edge of the body, level with the anal suckers there is a small spine.

The dorsum is covered anteriorly by a chitinized shield which appears to be divided by a transverse slit anterior to coxae II. There is a narrow, uncovered portion of the dorsum between the anterior and posterior shields, the latter extending from from about the level of coxae III to the posterior end of the body.

The female is larger than the male; legs similar to those of the male; the distance from the legs IV to the posterior tip of body being greater than in the male.

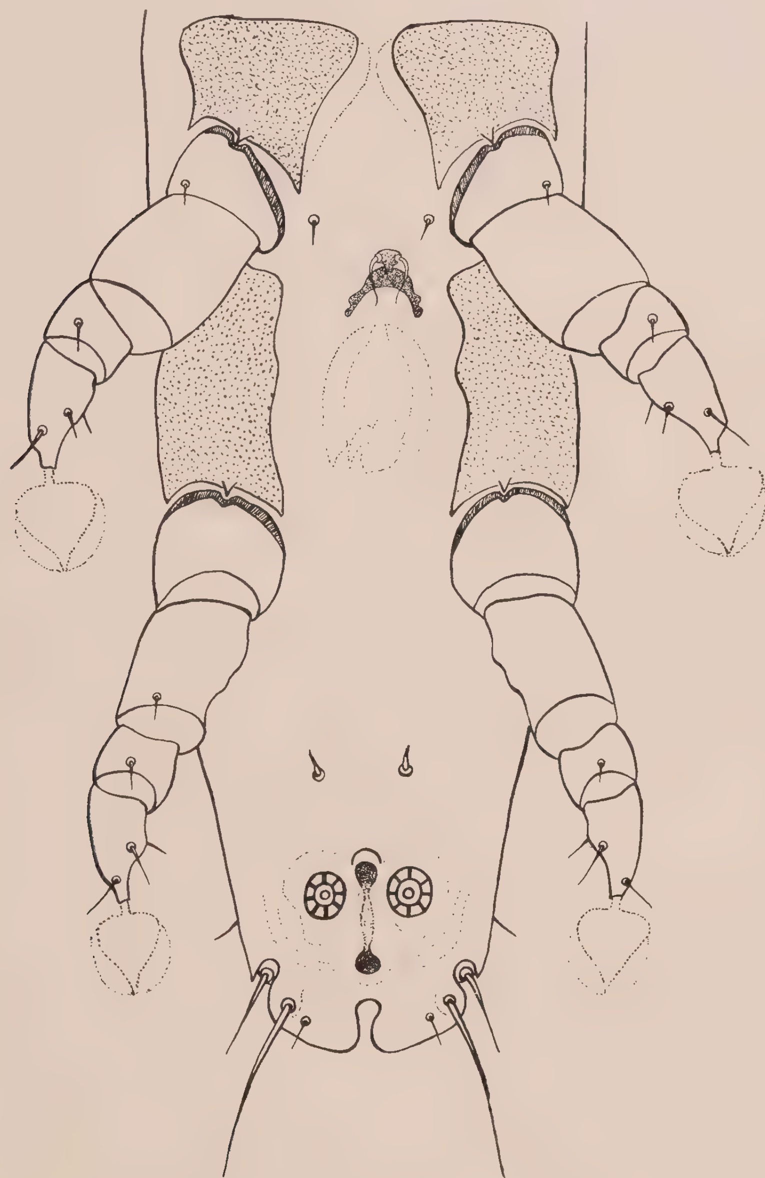


Fig. 1. — *Listrophorus grassii* n. sp. Male venter.

The genital pore lies between coxae III; venter covered with transverse rows of V -shaped, unchitinized flaps of skin -similar to that found in other species of the genus and in *Sarcoptes scabiei.*

The anterior part of the dorsum is covered by a chitinized shield which extends from below the level of coxae II to the anterior tip of the capitulum. Posterior to this shield the body is uncovered except for a narrow, chitinized, transverse band about level with coxae III. The uncovered portion of the dorsum has a series of transverse ridges or concertina-like folds in the integument.

Host. A mouse (*Oryzomys p. palustris* (Harlan, 1837)).

Locality. Brady Co., Georgia, U.S.A. 25 February 1948. HARVEY B. MORLAN.

Measurements. ♂ . 32 × . 11 mm.; ♀ . 45 × . 11 mm.

Listrophorus theodori n. sp.

Body elongate, elliptical; constricted posterior to legs IV. Differing from the other species of the genus in the shape and size of the penis and the posterior end of the body. (Fig. 2).

Legs I and II are placed well forward on the anterior half of the body; legs III and IV are placed on the posterior half of the body; almost equi-distant

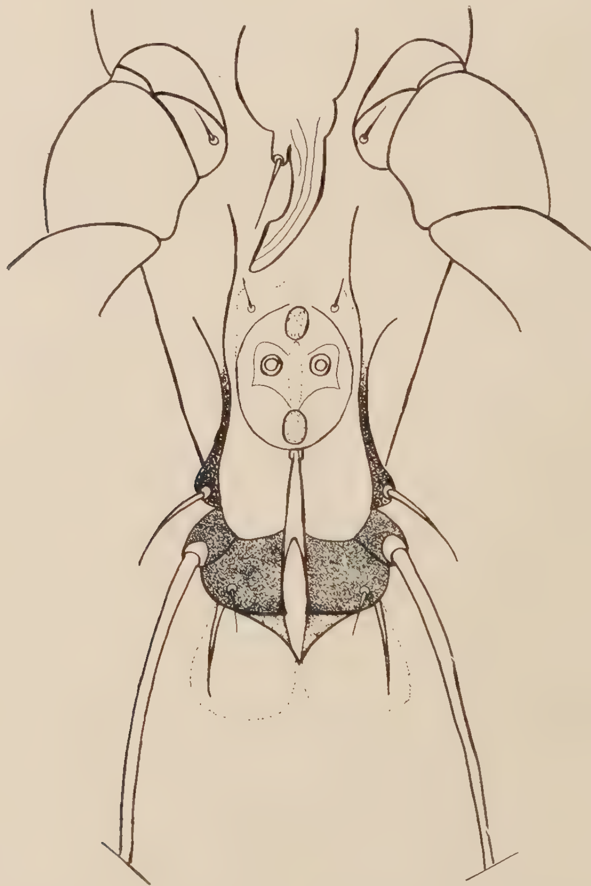


Fig. 2. — *Listrophorus theodori* n. sp. Male venter.

from one another and from the posterior tip of the body. The genital pore lies between legs III and IV; the penis is large and curved.

The posterior tip of the body is bilobed and heavily chitinized; on each lobe there is a hyaline flap posteriorly, and three spines in addition to a long, stout, terminal bristle, the latter being half as long as the body.

There are no outstanding characters in the female to seperate it from others of the genus.

Host. A gerbil (*Meriones l. libycus* Lichtenstein, 1823).

Locality. Tel Amal, Beisan, Israel. Prof. O. Theodor.

Measurements. ♂. 5 × .17 mm.; ♀. 56 × .12 mm.

Genus LISTROPHOROIDES Hirst, 1923

Listrophoroides oryzomys n. sp.

In shape broady elliptical; body constricted posterior to legs IV, with an indentation at the posterior tip of the body. Differing from all other species of the genus in the shape of the body and its chitinized, ventral platelets.

The male venter (Fig. 3) show legs I and II to be placed equi-distant from one another and from the capitulum; legs III and IV placed closer together and just posterior of the middle line of the body. Legs I and II with their tarsi formed into grasping organs; leg III slender; leg IV much longer and stouter than the others, with a tarsal sucker; the inner edge of the tarsus having two grooves which would appear to be used as auxilliary grasping organs.

The genital pore and penis are placed between and level with coxae IV. Chaetotaxy of the venter sparse.

The anterior third of the dorsum is covered by a chitinized shield, the posterior two thirds being covered by a second shield; the posterior end of this second shield being deeply indented, the indentation extending forwards to a point midway between the level of coxae iv and the posterior tip of the body.

Transversally across the dorsum at the level of legs III there is a heavily sclerotized bar which has in its middle, a stout, spine-like process which is directed posteriorly. In overcleared specimens this bar appears to be part of the ventral, chitinized strips lying between coxae III and IV.

The female is elongate, elliptical; the posterior end of the body being terminated by a blunt point, not with an indentation as in the male.

Tarsi of legs I and II are modified into clasping organs as in the male; legs III and IV are slender, similar to legs III of the male.

The anterior portion of the dorsum is covered with a chitinized shield as in the male, but the posterior shield is much reduced and extends only a short

distance behind the level of legs IV; the posterior end of the body being but weakly chitinized.



Fig. 3. — *Listrophoroides oryzomys* n. sp. Male venter

Host. A mouse (*Oryzomys p. palustris* (Harlan, 1837)).

Locality. Brady Co., Georgia, U.S.A. 25 February 1948. Harvey B. Morlan.

Measurements. ♂. 3 × .12 mm.; ♀. 38 × .15 mm.

SUMMARY

A review of the fur-mites (Listrophoridae Canestrini, 1892) is given. Three new species of these mites are described and figured; two new species in the genus *Listrophorus* Pagenstecher, 1861 one in the genus *Listrophoroides* Hirst, 1923.

Listrophorus grassii n. sp. is taken from a mouse (*Oryzomys p. palustris* (Harlan, 1837) and is named in honour of Prof. B. Grassi. *L. theodori* n. sp. is taken on a gerbil (*Meriones l. libycus* Lichtenstein, 1823) and named for Prof. O. Theodor. *Listrophoroides oryzomys* n. sp. is taken from a mouse (*Oryzomys p. palustris* (Harlan, 1837).

RIASSUNTO

Vengono passati in rassegna gli acari (*Listrophoridae* Canestrini, 1892) parassiti della pelliccia dei Vertebrati. Sono descritte ed illustrate tre nuove specie di questi acari: due del gen. *Listrophorus* Pagenstecher, 1861 ed una del gen. *Listrophoroides* Hirst, 1923.

Listrophorus grassii n. sp. è stata trovata su di un topo (*Oryzomis p. palustris* (Harlan, 1837)) e viene dedicata al Prof. B. Grassi. *L. theodori* n. sp. è stata repertata su un gerbillo (*Meriones l. lybicus* Lichtenstein, 1823) viene dedicata al Prof. O. Theodor. *Listrophoroides oryzomys* n. sp. proviene da un topo (*Oryzomys p. palustris* (Harlan, 1837).

BIBLIOGRAPHY

Canestrini, G. (1892): *Prosp. Acarof.*, *5*, 567.

Claparede, E. (1869): Studien an Acariden. *Z. wiss. Zool.*, *18*, 445-546.

Gunther, C. E. M. (1942): Notes on the Listrophoridae (Acarina: Sarcoptoidea). *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, *67*, 009-10.

Hirst, S. (1923): On some new or little Known species of Acari. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 49-69.

Pagenstecher, H. A. (1861a): *Listrophorus leuckarti*, ein neues Milbengeschlecht. *Siebold Kolliker. Zool.*, *11*, 109-19.

Pagenstecher, H. A. (1861b): *Listrophorus gibbus*, nebst nachtraglichen Bemerkungen uber *Listrophorus leuckarti. Siebold Kolliker. Zool.*, *11*, 151-61.

Poppe, S. A. (1887): Uber parasitische Milben. *Abh. naturw. Ver. Bremen.*, *10*, 1, 205.

Radford, C. D. (1940): Notes on some new species of parasitic mites. Pt. 3 *Parasitology*, *32*, 91-104.

Radford, C. D. (1942): New parasitic mites (Acarina). *Parasitology*, *34*, 294-307.

Radford, C. D. (1944): New parasitic mites (Acarina) from rodents. *Parasitology*, *35*, 161-6.

Radford, C. D. (1947): Parasitic mites from snakes and rodents (Acarina; Cheyletidae, Listrophoridae and Laelaptidae). *Proc. Zool. Soc. Lond.*, *117*, 228-40.

Radford, C. D. (1949): New parasitic mites (Acarina: Myialgesidae and Listrophoridae). *Proc Zool. Soc. Lond.*, *118*, 933-7.

Radford, C. D. (1950): The mites (Acarina) parasitic on Mammals, Birds and Reptiles. *Parasitology*, *40*, 366-94.

Radford, C. D. (1951): Two new genera of parasitic mites (Acarina: Laelaptidae and *Listrophoridae*). *Parasitology*, *41*, 102-4.

Radford, C. D. (1953): Four new species of « Harvest Mite » or « Chigger » and a new fur-mite (Acarina: Trombiculidae and Listrophoridae). *Parasitology*, *43*, 210-14.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SU *ANOPHELES HISPANIOLA* E SPECIE AFFINI DEL GRUPPO *PARAMYZOMYIA*.

GIULIO RAFFAELE (*)

Tra le specie di anofeli che l'EVANS (1938) comprende nel gruppo *Paramyzomyia*, *Anopheles cinereus* Theobald, ed *A. turkhudi*, Liston, vengono considerati in un sottogruppo a parte distinto sovratutto per i caratteri delle setole pleuriche anteriori mesotoraciche entrambe piumose.

Tale carattere distintivo delle due specie etiopiche si riscontra anche in *A. hispaniola*, Theobald ed in *A. italicus*, Raffaele, che possono considerarsi come rappresentanti paleartici del gruppo e sottogruppo sopra menzionati.

L'EDWARDS (in EVANS: 1938), in una nota aggiuntiva al testo da lui ordinato in seguito alla morte della EVANS, esprime l'opinione (pag. 336) che *A. hispaniola* ed *A. italicus* siano da considerare sinonimi di *A. turkhudi*, ma DE MEILLON (1947) giudica la posizione sistematica di *A. hispaniola* confusa e richiama l'attenzione sulle divergenze che si rivelano nelle due descrizioni fatte dal SENEVET (1931, 1935) dei caratteri della ninfa. Nella prima descrizione le lamine caudali (*paddles*) risultano simili a quelle di *A. turkhudi*, nella seconda dissimili. Inoltre il SENEVET (1935) afferma che le setole clipeali posteriori della larva sono corte mentre sono lunghe come in tutte le altre specie del gruppo.

Altre descrizioni non concordanti sono state date dei caratteri dell'uovo e dell'adulto osservati in località differenti, onde può forse riuscire utile rendere noto il risultato di osservazioni fatte dallo scrivente sull'uovo e sulla larva di ciascuna delle specie comprese nel sottogruppo.

1. *UOVO*. Tutte le specie comprese nel gruppo *Paramyzomyia* (che oltre alle specie già menzionate, comprende anche *A. listeri* ed *A. multicolori*) hanno uova sprovviste di galleggianti. Le uova di *A. cinereus* e di *A. turkhudi* presentano in corrispondenza del polo più largo una increspatura dell'esocorion che forma una struttura ovale e splendente per mezzo della quale l'uovo rimane

---

(*) *Istituto di Malariologia* «ETTORE MARCHIAFAVA». *Roma*.

sospeso per un polo alla superficie dell'acqua (De Meillon, 1934). Trattasi quindi di galleggianti rudimentali.

Per quanto riguarda *A. hispaniola*, vi sono tre differenti descrizioni della struttura dell'uovo: 1.) Nella prima descrizione fatta da Ed. ed Et. Sergent (1910) questo venne descritto e raffigurato come provvisto di cospicui galleggianti. 2.) Raffaele (1928) denominò *A. italicus* una specie rinvenuta in Calabria molto simile ad *A. hispaniola* per i caratteri della larva e dell'adulto ma dissimile per i caratteri dell'uovo che manca di ogni apparato di galleggiamento; le uova deposte dalle femmine vanno generalmente al fondo ove schiudono regolarmente. Tale carattere sarebbe stato sufficiente alla separazione di una nuova specie se non fosse intervenuta una rettifica di Et. Sergent (1937) con la quale si dichiarava erronea la prima descrizione e veniva descritto un uovo affatto simile a quello di *A. italicus* con la stessa tendenza a schiudere sul fondo dell'acqua. Nessun chiarimento veniva fornito circa la specie cui apparteneva il primo uovo descritto; comunque, se il secondo uovo era di *A. hispaniola*, pochi dubbi potevano sussistere circa l'assoluta identità con *A. italicus* che poteva quindi considerarsi sinonimo del precedente. 3. Una nuova versione sulla struttura dell'uovo di *A. hispaniola* è stata data recentemente da Aitken (1953) in base alle ovodeposizioni di una specie di anofele rinvenuta in Sardegna. L'uovo presenta una increspatura ovoidale splendente in corrispondenza del suo polo maggiore, simile a quella che si osserva in *A. cinereus* ed *A. turkhudi*.

Avendo avuto occasione in passato, durante i miei soggiorni in Etiopia, di esaminare le uova di queste specie, ho voluto esaminare l'uovo della specie sarda. Ho potuto così osservare alcune ovodeposizioni e l'uovo mi è sembrato affatto somigliante a quello di *A. cinereus* sia per la forma sia per la struttura della crespa ovoidale sulla superficie dorsale. Certamente è del tutto differente da quello descritto da me come uovo di *A. italicus* e da Et. Sergent come uovo di *A. hispaniola;* in questi manca la struttura che si osserva nel primo la quale è così appariscente che non sarebbe certamente sfuggita nè all'osservazione mia e dei miei colleghi del tempo nè a quella di Et. Sergent e tanto meno all'obbiettivo fotografico che ha raccolto l'immagine dell'uovo riprodotta nel lavoro del Sergent.

Anche la forma dell'uovo della specie sarda è differente da quella dell'uovo bananiforme della specie descritta come *A. italicus* (= *A. hispaniola* di Sergent. Evidentemente nella zona mediterranea sono presenti due specie del gruppo *Paramyzomyia*, una delle quali ha uova simili alla specie africana *A. cinereus* mentre l'altra ha uova simili a quelle descritte come *A. italicus*. Non è facile ora decidere a quale delle due specie si debba attribuire il nome di *A. hispaniola*.

2.) *LARVA*. Ho eseguito un attento esame della chetotassi del capo, del torace e dell'addome su larve di *A. turkhudi* raccolte in Eritrea (Ghinda) e in

Harar (Dire Daua), di *A. cinereus* di varie località dell'Etiopia, di *A. italicus* della Calabria e di *A. hispaniola* della Sardegna.

A. turkhudi è facilmente riconoscibile e distinto dalle altre 3 specie per i seguenti caratteri: *a*) le 6 setole frontali sono lunghe, nude o biforcate o triforcate dalla base; *b*) le setole palmate sono presenti dal IV al VI segmento addominale. EVANS (1938) dà le setole palmate presenti dal IV al VII segmento ma DE MEILLON (1947) le dà presenti, come quelle dei nostri esemplari, dal IV al VI. In un esemplare raccolto in Eritrea vi erano setole palmate rudimentali (4 foglioline) sul III segmento.

Nelle larve di *A. cinereus*, *A. italicus* ed *A. hispaniola* (Sardegna) le 6 setole frontali del capo sono piumose, sebbene meno dell'ordinario e le setole palmate sono presenti dal II al VII segmento addominale. La chetotassi larvale non sembra presentare differenze notevoli nelle 3 specie; le setole palmate sul II segmento addominale sono affatto rudimentali in *A. italicus* (2-3 foglioline), meglio sviluppate in *A. cinereus* ed *A. hispaniola* sarda (5-7 foglioline). Inoltre il filamento apicale delle foglioline appare essere brevissimo in *A. italicus*, ben distinto invece nelle altre due specie. Altre minori differenze osservate richiedono studi ulteriori su un numero congruo di esemplari onde stabilire la loro costanza.

* * *

In conclusione per i caratteri dell'uovo e della larva si può escludere la possibilità prospettata dall'EDWARDS che *A. turkhudi* sia specie identica ad *A. italicus* e ad *A. hispaniola*. Simili invece appaiono *A. cinereus* etiopico e le specie della Sardegna classificata come *A. hispaniola*, almeno per quanto riguarda i caratteri dell'uovo e della larva. Simili sono anche con ogni probabilità *A. italicus* e la specie dell'Algeria classificata dal SERGENT come *A. hispaniola* le quali sono entrambe differenti da *A. cinereus* per i caratteri dell'uovo. Anche l'adulto di *A. italicus* si distingue da *A. cinereus* sopratutto per i caratteri del mesonoto che in *cinereus* è ricoperto di squame bianche che sono rarissime in *italicus* il cui mesonoto è quasi nudo. La specie sarda ha mesonoto simile a quello di *A. cinereus*.

E' evidente quindi che nella regione mediterranae vi sono due specie del gruppo *Paramyzomyia*: una molto somigliante ad *A. cinereus* e l'altra apparentemente simile ad *A. italicus*. Occorre ora decidere quale delle due specie si debba considerare come *A. hispaniola* oppure se eventualmente esista una terza specie il cui uovo corrisponda alla descrizione data dai fratelli SERGENT. nel 1910, ma tale possibilità non è stata avanzata neanche dagli stessi SERGENT. Personalmente credo che *A. italicus* corrisponda ad *A. hispaniola* e che la specie sarda sia identica ad *A. cinereus*.

SOMMARIO

Vengono prese in esame le diverse descrizioni fatte dell'uovo di *A. hispaniola* che vengono confrontate con quelle delle uova di *A. turkhudi*, di *A. cinereus* e di *A. italicus*. *A. turkhudi*, per i caratteri dell'uovo e la chetotassi larvale, va considerato come specie affatto distinta dalle altre. L'uovo di *A. cinereus* risulta simile a quello di una specie descritta in Sardegna e classificata come *A. hispaniola;* entrambi presentano una crespa splendente ovoidale al polo maggiore. L'uovo di *A. italicus* è simile a quello di una specie descritta in Algeria e classificata come *A. hispaniola*, entrambi mancano della struttura che si osserva nelle prime due specie ed hanno tendenza a schiudere sul fondo dell'acqua.

Si conclude che nella zona mediterranea esistono due specie di anofeli appartenenti al gruppo *Paramyzomyia*: una che corrisponde morfologicamente ad *A. cinereus* etiopico ed un'altra che corrisponde ad *A. italicus*. Ad entrambe è stato attribuito il nome di *A. hispaniola*. Si esprime l'opinione che tale denominazione vada attribuita alla specie descritta in Calabria come *A. italicus* il quale differisce da *A. cinereus* e dalla specie della Sardegna anche per i caratteri del mesonoto dell'adulto che si presenta quasi nudo mentre nelle altre due specie è ricoperto di squamme bianche.

SUMMARY

There are taken into consideration the different descriptions of the eggs of *A. hispaniola* wich are compared with those of *A. turkhudi*, *A. cinereus* and *A. italicus*.

A. turkhudi by the characters of the eggs and larval chaetotaxy must be considered as a species quite distinct from the others. The egg of *A. cinereus* appears to be similar to that of a species described in Sardinia and labelled *A. hispaniola;* both have an ovale glistening fril towards the larger end. The egg of *A. italicus* is similar to that of a species described in Algeria and considered to be *A. hispaniola*, in both is missing the patch observed in the species quoted above and both exibit a tendency to sink down and to hatch at the botton of the water.

Conclusively it is believed that in the Mediterranean region there are two species of anephelines belonging to the group *Paramyzomya*: one whose morphological features appear to be similar to those of the aethiopian *A. cinereus* and another which seems quite similar to *A. italicus*. Both have been named *A. hispaniola*. It is suggested that the latter name should be ascribed to the Calabrian species described as *A. italicus* which furtherly differs from *A. cinereus* and from the Sardinian species by the characters of the mesonotum of the adult which in the former is almost bare while in the latter two species is covered by white scales.

BIBLIOGRAFIA

AITKEN, T. H. G., (1953): in LOGAN'S « The Sardinian Project », p. 348.

DE MEILLON, B. (1947): The anophelini of the Ethiopian Region, *South African Inst. Med. Res.*, Johannesburg.

EVANS, A. M. (1938): Mosquitoes of the Ethiopian Region, II, British Museum, (Natural History). London.

LOGAN, J. A. (1953): The Sardinian Project, The John Hopkins Press, Baltimore.

RAFFAELE, G. (1928): *Riv. Malariol.*, 7, 11.

SENEVET, G., (1931): *Arch. Inst. Pasteur d'Algèrie*, *9*, 17.

SERGENT, ED & ET., (1910): *Ann. Inst. Pasteur*, *24*, 910.

SERGENT, ET., (1937): *Arch. Inst. Pasteur d'Algèrie*, *15*, 101.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

SUR LA TOPOGRAPHIE THORACIQUE DES PHLEBOTOMES (*NEMATOCERA*)

J. RANQUE (*) et R. M. NICOLI (*)

L'étude anatomique des Phlébotomes reste encore bien imparfaite. Ce fut B. Grassi qui, en 1907, jeta les bases de cette étude. Quelques années plus tard, R. Newstead, en 1911, reprend la plupart des données de l'auteur italien. S. R. Christophers, H. E. Shortt et P. J. Barraud, 1926 tente de mener à bien une description générale de l'anatomie de *Phlbotomus argentipes*, description qui se limita malheureusement à la tête et aux pièces buccales. A la même époque (1926), S. Adler et O. Theodor décrivent le tube digestif et les organes génitaux féminins de *Phlebotomus papatasi*. V. Nitzulescu, 1926-1927, puis P. P. Perfiliev, 1926-1928 précisent, le premier quelques points de détails, le second quelques notions histologiques générales.

Depuis quelques années, nous poursuivons des recherches sur la race insulaire corse *Phlebotomus perniciosus legeri* (J. Mansion, 1913). Il nous a semblé utile de reprendre une partie de nos observations sur la topographie thoracique de cette espèce.

Nomenclature anatomique: L'anarchie règne encore dans la nomenclature anatomique. Nous avons adopté une nomenclature anatomique latine, désignant les divers organes par leurs rapports avec l'exosquelette, sans jamais faire appel à des distinctions d'ordre physiologique ou de priorité. De plus, nous avons unifié les noms splanchnologiques dans tout le phylum des Arthropodes. Nous nous sommes longuement étendus sur ce sujet précédemment à deux reprises. (voyez plus loin bibliographie).

(*) *Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Marseille*: (Directeur: Prof. J. Ranque).

Le *Thorax*, comme chacun le sait, est divisé en 2 parties:

— *Prothorax* portant la première paire de pattes.

— *Pterothorax* divisé à son tour en *Mesothorax* portant la seconde paire de pattes et la première paire d'ailes, et en *Metathorax* portant la troisième paire de pattes et la seconde paire d'ailes involuées à l'état de balanciers.

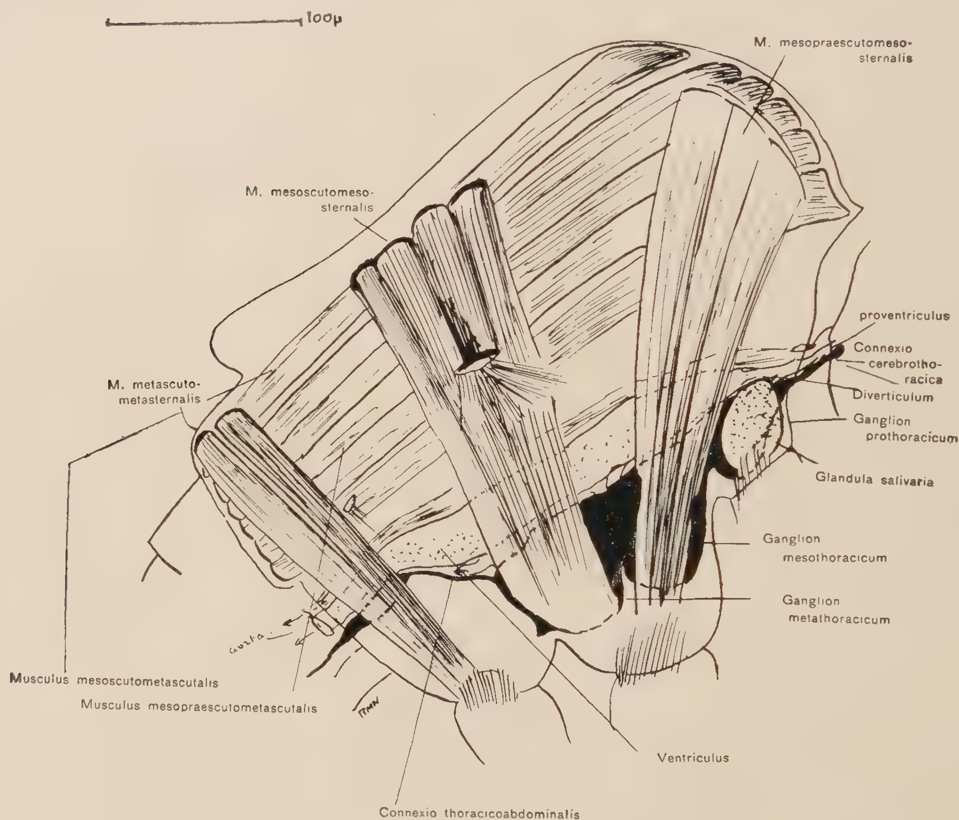


Figure 1 - Thorax mâle, vue laterale.

Chaque segment thoracique comprend 3 pièces de haut en bas:

Notum, pièce impaire.

Pleurae, pièces paires, droite et gauche.

Sternum, pièce impaire.

Le *Notum* se subdivise en: *Praescutum*, antérieur.
Scutum, médian.
Scutellum, postérieur.

Chaque *Pleura* se subdivise en 2: *Scutopleura* (:épimère), supérieure.
Sternopleura (: épisterne), inférieure.

Le *Sternum* se subdivise en 3: *Praesternum*, antérieur.
Sternum, médian.
Sternellum, postérieur.

Un certain nombre de pièces involue chez les Phlébotomes, d'autres se compliquent.

On ne reconnait pas le *Proscutellum*, la *Proscutopleura*, le *Propraesternum*, le *Mesopraesternum*, le *Metapraescutum*, le *Metascutellum* et le *Metapraesternum*. Le *Prothorax* est donc particulièrement involué. Son ouverture antérieure reçoit l'insertion de la membrane cervicale.

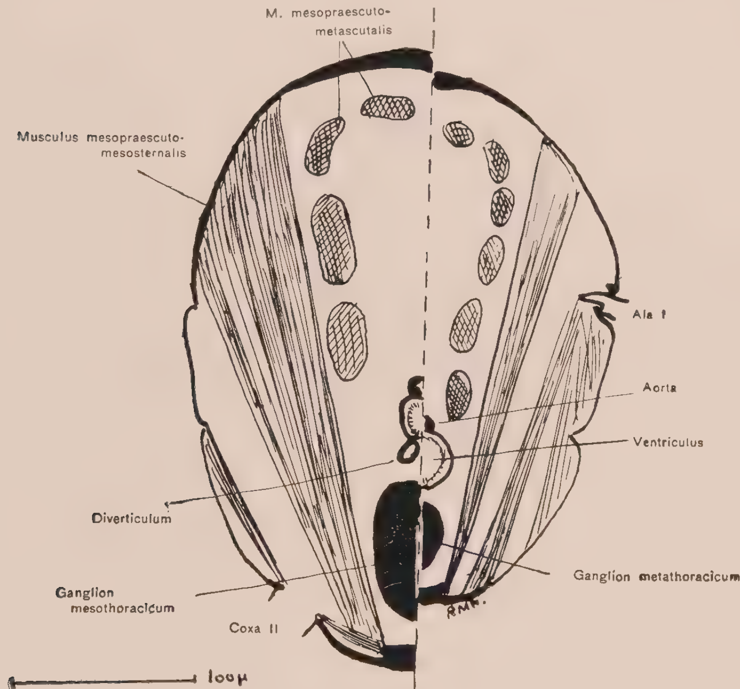


Figure 2 - Thorax mâle coupes: à droite selon le plan alaI-mesosternopleura; à gauche selon le plan mesoscutum-coxaII.

Le *Stigma prothoracicum* s'ouvre largement sur les bords du *Proscutum*. Le *Stigma metathoracicum* s'ouvre sur le bord postérieur de la *Metascutopleura*. Enfin, nous avons décrit des soies très longues de type α : *Setae pronotales propleurales, mesopraescutales, mesoscutales, mesoscutellales, mesoscutopleurales, mesosternopleurales, metascutales* et *metascutopleurales*.

A la limite des pièces sternales, l'*Apodemia endothoracica* (:furca) donne insertion à de muscles importants.

Le *Metathorax* est soudé en arrière à l'*Urum I* abdominal.

Au niveau du foramen prothoracicum

Un certain nombre d'organes pénétre dans la cavité thoracique. Latéralement cheminent quelques fibrilles musculaires du *Musculus verticopropraescutalis.*

1. En bas, contre la paroi et médian, le tronc nerveux: c'est la *Connexiocerebrothoracica* unissant le *Ganglion infraoesophageale* au *Ganglion prothoracicum.*

2. En bas, latéralement, les deux *Ducti salivarii* qui se réunissent dans le *Cervix* en un *Ductus hyposalivarius.*

3. Au dessus, le tube digestif. C'est le *Proventriculus*, zône de transition avec le *Mesenteron*, limité en avant par l'*Oesophagus*, en arrière par le *Cardia* (*).

En son voisinage direct, le *Ganglion sympathicum cervicale* est en rapport avec les *Corpora allata* céphaliques.

4. Enfin, l'*Aorta* commence à ce niveau et se poursuit au delà dans le *Thorax.*

Tous ces organes sont entourés dans un conjonctif lâche. Des trachées circulent également: ce sont les *Tracheia hypocranialis* et *Tracheia cephalica,* divisée en 2 branches:

Tracheia epicranialis et *Tracheia cerebralis.*

Tracheia hypocranialis et *Tracheia cephalica* convergent dans le *Prothorax*, vers le *Stigma prothoracicum.*

La cavité thoracique

Il est difficile de décrire dans son ensemble la cavité thoracique. Nous devons donc, dès maintenant donner quelques points de repère.

1. Le muscles, très importants, noyés dans un conjonctif pariétal, occupent la majeure partie de la cavité.

2. Dans l'espece résiduel, les organes se disposent en trois plans, de bas en haut:

un plan nerveux inférieur.
un plan digestif moyen.
un plan circulatoire supérieur.

Les muscles

La musculature de ces insectes est très complexe. Les fibres des muscles thoraciques, très souvent séparées, font perdre son individualité au muscle qui semble fragmenté.

(*) Notons qu'il n'est pas possible de conserver la terminologie usuelle adoptée chez les Phlébotomes. La position du collier périoesophagien indique que le « Pharynx » des auteurs est en réalité l'*Oesophagus.*

Il existe deux types de muscles:

1. des muscles moteurs des appendices peu chromophiles.
2. des muscles pariétaux très chromophiles.

1. *Les Muscles moteurs des appendices*

Ce sont des muscles externes par rapport aux suivants, Muscles prothoraciques pour la *CoxaI* (*Musculi coxoIpropleuralis* et *coxoIprosternalis*). Muscles ptérothoraciques pour la *CoxaII* (*Musculi coxoIImesosternopleuralis* et *CoxoIImesosternalis*), la *CoxaIII* (*Musculi coxoIIImetasternopleuralis*, *coxoIIImetasternalis*), l'*AlaI* (*Musculi aloImesosternopleuralis*, *aloImesoscutopleuralisI* et *aloImesoscutopleuralisII*, *aloImesosternalis*), l'*AlaII* (*Musculi aloIImetascutopleuralis* et *aloIImetasternopleuralis*).

Tous ces muscles sont fort peu visibles et grèles. Ils se confondent sur la plupart des préparations avec les suivants.

2. *Les muscles pariétaux*

Ces muscles beacoup plus gros soutendent le thorax. Ils ont un rôle moteur, du moins classiquement, mais vraisemblablement leurs fonctions sont beaucoup plus complexes (rôle respiratoire). Ces muscles sont transversaux ou longitudinaux.

a) *Les muscles transversaux.*

Ils sont externes par rapport aux suivants.

Musculus mesopraescutomesosternalis constitué par 6 fibres musculaires en cylindre évasé à la partie supérieure.

Musculus mesoscutomesosternalis avec 4 fibres musculaires en ligne.

Musculus metascutometasternalis avec 2 fibres seulement.

b) *Les muscles longitudinaux.*

Au nombre de 2:

Musculus mesopraescutometascutalis avec 5 fibres musculaires groupant chacune respectivement de bas en haut environ 25, 25, 22, 20 et 14 fibrilles.

Musculus mesoscutometascutalis, confondu le plus souvent avec le précédent, au dessus avec une seule fibre musculaire de 25 fibrilles environ.

Le plan nerveux

C'est le plan inférieur.

Les ganglions thoraciques sont groupés en une masse complexe issue de la fusion des ganglions primitifs. Cette masse est située dans la partie basse du *Prothorax* et du *Mesothorax*.

Le *Ganglion prothoracicum* est uni, nous l'avons vu, au *Ganglion infraoe-*

sophageale par la *Connexio cerebrothoracica.* Il donne naissance au *Nervus podalisI* sur face inférieure.

Le *Ganglion mesothoracicum,* soudé au précédent donne naissance aux *Nervus podalisII* (face inférieure), *Nervus alalisI* et *Nervus mesothoracicus* (face supérieure).

Le *Ganglion metathoracicum,* soudé également, donnant naissance aux *Nervus podalisIII* (face inférieure), *Nervus alalisII* dont une partie des fibres s'épuisent dans l'*Organum chordotonale* des balanciers, *Nervus metathoracicus* (face supérieure).

Ce Ganglion se prolonge en arrière vers les *Ganglionia abdominalia* par la *Connexio thoracicoabdominalis.*

Le plan digestif

Le *Stomodaeum* montre son dernier segment dans le *Prothorax.* C'est, nous l'avons vu, le *Proventriculus,* donnant latéralement naissance au *Diverticulum.*

Le *Proventriculus,* conduit d'environ 60 microns de long, présente un épithélium pavimenteux limité extérieurement par une basale, avec quelques fibres musculaires très fines. A la partie distale, l'épithélium, tout en restant unicellulaire, devient cylindrique, c'est le *Cardia* (*), origine de la *Membrana peritrophica.*

Le *Diverticulum,* s'étend ventralement sur 400 à 750 microns, plissé ou dilaté, rempli ou non d'un liquide aqueux plus ou moins visqueux.

Le *Mesenteron* est la région moyenne endodermique du tube digestif. Seul, le *Ventriculus* est thoracique.

C'est un conduit non extensible, constitué par une épithélium cylindrique cilié, à cils d'autant plus courts qu'on s'éloigne de la région antérieure. Ces cils disparaissent même totalement chez le mâle.

Cet épithélium est doublé intérieurement par la *Membrana peritrophica,* d'origine ectodermique comme nous le disons plus haut.

En avant et latéralement, dans le *Prothorax,* se trouvent les deux *Glandulae salivariae,* volumineuses, plus ou moins ovoïdes. Il existe une glande droite et une glande gauche. Ces organes de taille variable selon le sexe (mâle 60-80 microns, femelle 120-170 microns) et selon le cycle digestif sont des organes épithéliaux d'aspect acineux.

La glande, d'abord petite, voit la cavité de l'acinus augmenter avec apparition de granulations très fines dans la lumière.

Nom pris également dans un sens très différent de celui des auteurs. Le « cardia » de ceux-ci n'est en effet que la partie antérieure du *Ventriculus* (endodermique). Ce n'est pas l'homologue du *Cardia* des autres insectes (ectodermique).

Le plan circulatoire

Le vaisseau dorsal se poursuit sur toute la longueur du *Thorax*: c'est l'*Aorta*, très profonde, donnant naissance en arrière au *Cor* ou vaisseau dorsal proprement dit dilaté.

Le conjonctif

Un conjonctif à rôle surtout excréteur entoure les divers organes: c'est le *Corpus adipale* dont on distingue:

una couche externe pariétale: *Corpus adipale prothoracicum*, *Corpus adipale mesopraescutales*, *Corpus adipale mesoscutales*, *mesoscutellales*, *metascutales*.

une couche interne viscérale: *Corpus adipale salivarium*, autour des Glandes salivaires, *Corpus adipale stomodaeale*, autour du *Stomodaeum*, *Corpus adipale mesenterale*, autour du *Mesenteron*.

Latéralement, les deux *Tracheiae laterales* donnent naissance sur leur face externe aux *Tracheiae prothoracica* et *metathoracica*, sur leur face interne, à des trachées secondaires (*Tracheiae transversales*). De plus, des trachées périphériques gagnent les pattes et les ailes, d'autres viscérales, les divers organes.

Conclusion

La topographie thoracique des Phlébotomes et surtout la distinction des divers étages du tube digestif présente un grand intérêt. Il y aurait avantage à utiliser une terminologie anatomique précise dans l'étude des diverses parasitoses, en particulier des leishmanioses, rencontrées chez les Phlébotomes.

RESUME

Etude topographique sommaire du Thorax des phlébotomes. Il est possible de distinguer dans le thorax 2 zones :

1) une zone pariétale musculaire.
2) un espace résiduel à 3 plans :
— un plan inférieur nerveux ;
— un plan digestif moyen ;
— un plan circulatoire supérieur.

Il est souhaitable d'unifier la nomenclature en donnant des noms latins aux différentes pièces anatomiques. Il serait particulièrement indiqué d'utiliser cette terminologie dans l'étude épidémiologique des maladies parasitaires transmises par les phlébotomes comme les Leishmanioses par exemple.

RIASSUNTO

E' stato fatto uno studio topografico completo del torace dei flebotomi. E' possibile distinguere nel torace due zone:

1) una zona parietale muscolare.
2) uno spazio residuo a tre piani:
— un piano inferiore nervoso;
— un piano digestivo medio;
— un piano circolatorio superiore.

E' auspicabile che venga unificata la nomenclatura dando nomi latini ai diversi elementi anatomici. Sarebbe particolarmente opportuno usare tale terminologia nello studio epidemiologico delle malattie parassitarie trasmesse dai flebotomi, quali per esempio le leishmaniosi.

SUMMARY

A topographical study of the phlebotomus thorax is given: It is possible to distinguish two zones:

1) a muscular parietal zone.
2) a residual space with three layers:
— a nervous inferior layer;
— a digestive middle layer;
— a circulatory superior layer.

The use of latin words to designate the different anatomic pieces is recommended to shum the nomenclature's difference. This would be usefull in the study of parasitical diseases transmitted by phlebotomus, for example: Leishmaniasis.

BIBLIOGRAPHIE

ADLER S., THEODOR O. (1926): The mouth parts, alimentary tract and salivary Apparatus in the Female in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Paras., XX.* 109-142. pl. VIII-XIV.

BERLESE A. (1909): Gli insetti: loro organizzazione, sviluppo, abitudini e rapporti coll'uomo. t. I XII + 1004 p.

CHRISTOPHERS S. R., SHORTT H. E. et BARRAUD P. J. (1926): The anatomy of the Sandfly *Phlebotomus argentipes* Ann. and Brun. (Diptera). I. The Head and Mouth parts of the Imago. *Ind. Med. Res. Mem. n. 4*, 177-204. p. XVI-XXV.

GRASSI B. (1907): Ricerche sui flebotomi. *Mem. Soc. Ital. Sc. S. 3ª, XIV.* 353-394.

NEWSTEAD R. (1911): The papatasi flies (*Phlebotomus*) of the Maltese Islands. *Ann. Trop. Med. Paras., V*, 139-186. et *Bull Ent. Res., II.* 47-78 3 pl.

NICOLI R. M. (1955): Essai sur l'anatomie imaginale du *Phlebotomus perniciosus tegeri* (J. Mansion, 1913). *DES. Sc. Nat. Faculté sc. Marseille*, 108 p., 95 fig., 32 photos.

NICOLI R. M. (1953): Essai sur la biologie des *Phlebotomidae*. I° partie. Thèse Médecine Marseille. 205 p.

NITZULESCU V. (1926): Sur la constitution du canal alimentaire des Phlébotomes. *Bull. Soc. Path. exot., XIX*, 709-714.

NITZULESCU V. (1928): Cateva contributsiuni la studiul aparatului buccal al insectelur Intepatoare. Iasi Viata romîneasca. 50 p. (résumé français).

PERFILIEV P. P. (1926): Sur l'anatomie des moustiques du genre *Phlebotomus* (Diptera). *Rev. Russe Entom., XX*, 308-319 (en russe).

PERFILIEV P. P. (1928): Sur l'anatomie des Phlébotomes. *Bull. Soc. Path. exot., XXI*, 159-171 et 254-257.

PERFILIEV P. P. (1928): Zur vergleichenden Anatomie von *Phlebotomus (Diptera Psychodidae). Zeitscher f. Paras., I*, 437-475.

SNODGRASS R. E. (1935): Principles of insect Morphology.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

UN NOUVEAU CAS DE COENUROSE CHEZ LE BABOUIN *THEROPITHECUS GELADA* RUPPELL.

J. RODHAIN (*) et M. WANSON (*)

Le 9 juin de l'année dernière, le Directeur du Jardin Zoologique d'Anvers nous envoya examen, un babouin qui présentait une tumeur saillante au niveau du thorax en avait, de plus, le ventre anormalement distendu. Il s'agissait d'une femelle adulte. L'animal était renseigné comme originaire de l'Abyssinie et de l'espèce *Theropithecus gelada* Ruppell. Le singe, en bon état de nutrition générale, présentait sur la ligne mammellaire antérieure droit, en-dessous du mamelon, une excroissance en forme de grosse poire, à extrémité distale arrondie, munie d'un pédicule légèrement aminci. Il avait manifestement un très gros ventre avec quelques veinosités accusées. Pas de ganglions engorgés à l'aine ni aux aisselles.

La tumeur externe, recouverte de peau inaltérée était molle à la palpation et donnait l'impression d'être lobée à l'intérieur. La ponction ramena difficilement 1 cc. de liquide clair. La ponction de l'abdomen au moyen d'une aiguille de calibre moyen donna 5 cc. d'un liquide clair après quoi l'aiguille s'obstrua. La percussion indiquait de l'ascite, mais la perception du flux était peu nette.

Etant autorisés à sacrifier l'animal nous le tuons au chloroforme.

A l'incision de la tumeur externe il s'écoule un grand nombre de vésicules de diverses grandeurs contenant un liquide clair et une série de petites taches blanches, grosses comme des grains de millet.

Nous eûmes d'emblée l'impression qu'il s'agissait de coenures, ce qu'un rapide examen microscopique confirma.

A l'incision de l'abdomen nous nous trouvons devant une masse impressionante de vésicules du même type que celles contenues dans la tumeur externe. La masse était indépendante des viscères, foie, rate, reins, intestins, mais attachée à la paroi abdominale droite, dont nous l'avons séparée à coups de ciseaux.

(*) *Institut de Médicine Tropicale Prince Léopold.* (Directeur: Prof. A. DUBOIS).

Quelques rares vésicules isolées se rencontraient en rapport avec le mésentère et indépendantes de la grosse masse.

A l'ouverture du thorax, les poumons et le coeur étaient normaux.

La masse entière de vésicules de la tumeur externe et l'ensemble recueilli dans l'abdomen pesait 1.980 gr.

* * *

Examinées à frais, les vésicules sont contractiles et animées de contractions péristaltiques périodiques, surtout si elles sont exposées à la chaleur et l'illumination de la lampe du microscope. Nous avons compté pour 100 gr. de la masse. 50 vésicules de toutes tailles. Le nombre de scolex dans les vésicules était très variable. Certaines petites vésicules n'en montraient pas, dans d'autres ils étaient nombreaux.

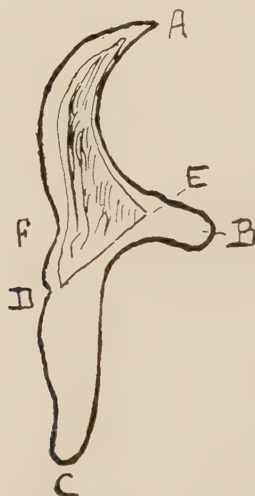


Fig. 1 - Profil d'un crochet.

Les 3 photographies de la planche I reproduisent l'image des vésicules qui répond à l'áspect typique de coenures. Afin de déterminer le diagnostic spécifique de ce stade larvaire nous avons étudié les crochets des têtes des scolex et procédé à des essais d'infestation de chiens et de rats.

Le tableau ci-dessous détaille les dimensions des crochets, dont le nombre est de 28. Les mensurations ont été faites d'après la méthode P. A. CLAPHAM (1).

Coenures de singe.

GRANDS CROCHETS.

Vesicules filles: scolex invaginés. — *scolex évaginés (en dehors de la vésicule).*

N°	A C	A B	A D	A E	B C	N°	A C	A B	A D	A E	B C
1	109	66	85	61	59	14	141	80	106	66	87
2	103	66	80	56	63	15	133	75	101	60	87
3	114	69	88	66	69	16	138	80	103	71	82
4	109	71	85	66	65	17	141	77	106	71	90
5	109	69	88	56	61	18	136	75	103	68	82
6	119	66	90	63	61	19	146	80	109	73	90
7	116	66	93	63	66	20	141	77	106	71	90
8	119	66	93	63	66	21	138	75	103	69	82
9	122	69	93	66	69	22	143	77	106	74	87
10	119	71	93	63	66	23	143	77	103	71	92
11	122	71	93	66	69	24	138	75	103	71	82
12	122	74	95	69	69	25	146	80	109	74	92
13	119	66	95	66	69	26	141	77	106	71	90
Moyennes	*116*	*68*	*90*	*63*	*66*	Moyennes:	*140*	*77*	*105*	*70*	*87*
						Moyennes générales:	**128**	**73**	**83**	**67**	**77**

PETITS CROCHETS.

N°	A C	A B	A D	A E	B C	N°	A C	A B	A D	A E	B C
1	95	53	69	48	61	14	104	58	82	48	72
2	95	48	66	45	64	15	104	53	80	45	72
3	92	51	66	45	59	16	104	56	87	45	72
4	101	51	69	48	66	17	104	53	82	45	72
5	101	48	71	43	61	18	104	56	82	46	72
6	98	51	74	48	56	19	109	58	90	50	72
7	92	53	74	45	59	20	101	56	80	46	72
8	98	53	72	48	59	21	109	58	90	48	72
9	95	53	74	48	59	22	109	58	90	48	72
10	95	53	74	50	59	23	104	53	80	46	72
11	96	53	72	45	59	24	101	53	80	45	72
12	98	53	72	45	62	25	101	53	80	46	72
13	95	53	72	50	64	26	104	56	82	48	72
Moyennes:	*96*	*52*	*71*	*47*	*60*	Moyennes:	*104*	*56*	*83*	*47*	*72*
						Moyennes générales:	**100**	**54**	**77**	**47**	**66**

A E = ventrale de la lame.
A D = dorsale.
A C = longeur. totale.
Mensuration des crochets d'après CLAPHAM.

L'examen de ce tableau montre que les dimensions des petits crochets n'offrent que fort peu d'écarts, les grands crochets, au contraire diffèrent dans des proportions assez notables.

Il est à remarquer aussi que les dimensions des crochets des scolex invaginés des vésicules filles endogènes sont plus petites que celles des crochets des scolex évaginés en dehors de la vésicule mère. Ces différences sont à mettre sur le compte du degré de maturation des scolex.

Quoi qu'il en soit, nous voyons que les crochets des scolex évaginés que nous supposons matures varient en longueur totale de 133 à 146 μ, avec une moyenne de 140 μ. La longueur moyenne des lames, côté dorsal, atteint 105 μ et côté ventral 70 μ.

Nous reportant au tableau dressé par P. A. Clapham ces dimensions correspondent à celles qu'il considère comme caractérisant le groupe de *Multiceps multiceps* Leps dans lequel il range *Multiceps serialis* qu'il considère d'ailleurs comme synonyme du premier.

Sans doute aurions nous pu mesurer un plus grand nombre de crochets, de façon à donner à nos mensurations une réelle valeur statistique, mais les données se superposant tellement près à celles de l'auteur anglais, nous n'avons pas cru devoir insister autrement.

En vue d'obtenir le stade adulte de nos larves nous avons fait ingérer un certain nombre de vésicules portant des scolex à 3 chiens adultes et à 4 rats. Toutes ces vésicules montraient des vésicules filles exogènes dont un certain nombre portaient des scolex.

Les chiens et un rat ingérèrent le matériel parasité le 11-VI-53, deux jours après l'autopsie du babouin; trois autres rats reçurent les vésicules le lendemain. A ce moment les vésicules étaient encore vivantes, montrant les mouvements caractéristiques.

Cet essais d'infestation n'eut pas de succès.

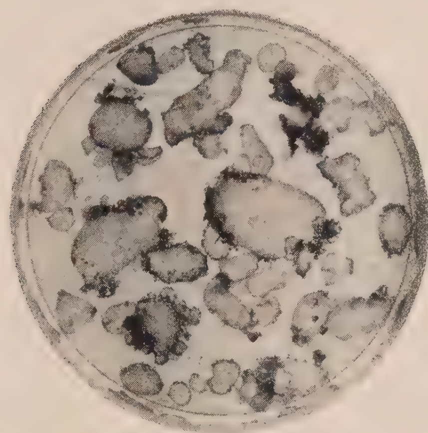
Les deux premiers rats soumis à l'expérience furent sacrifiés le 15-VII-53, soit 26 jours après l'ingestion des scolex. Ils furent trouvés indemnes de vers. Les deux autres rats furent tués un mois plus tard. Ils ne furent pas, non plus, trouvés infestés.

Quant aux chiens, tenus soigneusement en observation durant plus de 3 mois, aucun d'eux n'élimina ni oeufs ni proglotis. Deux d'entre eux vivent encore actuellement sans être parasités. Le troisième fut tué pour autopsie et trouvé indemne de vers.

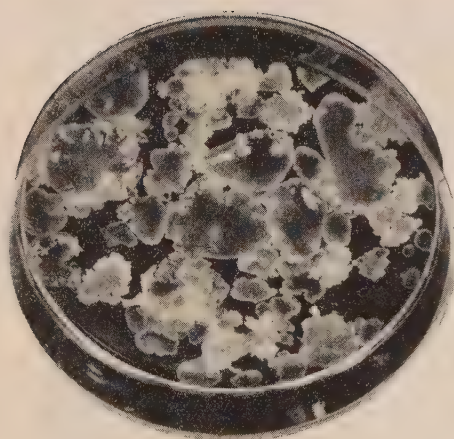
Discussion.

Ainsi que le rappelle Sandground (2) les premières observations concernant l'infestation de babouins par des coenures datent de 1926 et furent faites par Scott (3) à Londres. Il s'agissait de deux animaux morts au Jardin Zoologique.

PLANCHE I



Photographie 1



Photographie 2



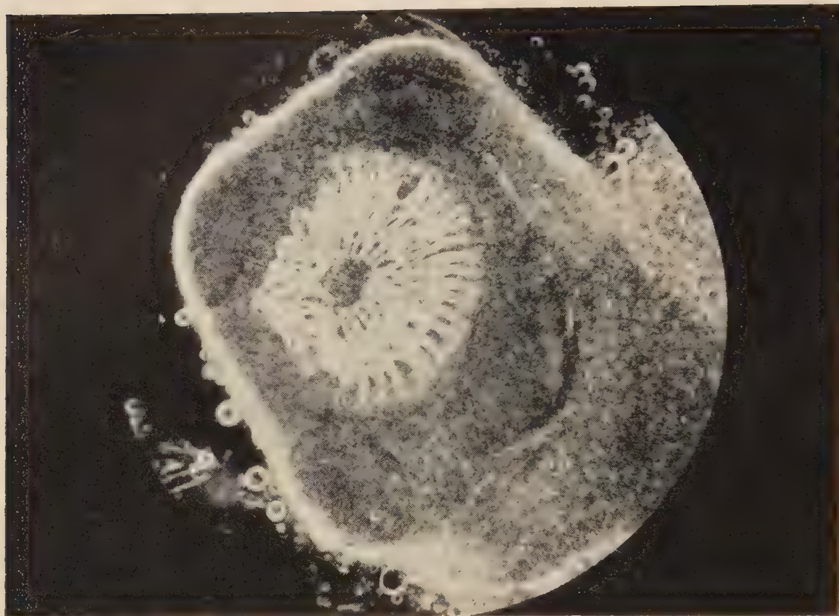
Photographie 3

Photographie des vésicules non fixées de la masse kystique de l'abdomen

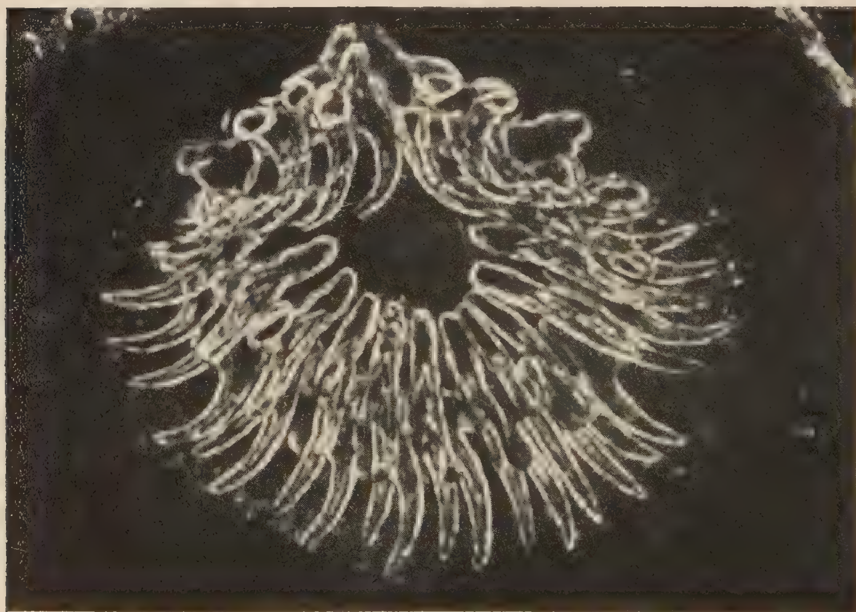
Photographie 1 : Fond clair

Photographie 2 et 3 : Fond noir

PLANCHE II



Photographie 4



Photographie 5

Photographie 4 : Scolex non applati. Grossissement 126.
Photographie 5 : Couronne double des crochets du scolex. Grossissement 300.

Ils appartenaient à l'éspece *Theropithecus gelada*. Aucune tentative d'infestation d'autres animaux ne fut faite et la détermination spécifique des coenures resta en suspens.

L'année suivante, 1927, SCHWARTZ (4) décrivit en détail le cas d'une coenurose rencontrée chez un babouin, *Theropithecus obscurus*, synonyme de *Therepithecus gelada* du Parc Zoologique à Washington.

SCHWARTZ réussit à infester des chiens. La forme adulte correspondait exactement, dit SANDGROUND, à celle de *Multiceps serialis*, telle que HALL l'a décrite. Lorsque SCHWARTZ tenta d'infester au moyen d'oeufs et de proglotis 5 lapins et 2 agneaux, il échoua. Se basant sur ce dernier fait il se crut autorisé à créer une variété nouvelle: *Multiceps serialis theropitheci*, physiologiquement différent de l'espèce type.

Ultérieurement, en 1939, ELIK et FINKELSTEIN (5) rapportèrent l'observation d'une coenurose chez un babouin de la même espèce que les précédents. Il s'agissait de cystes multiples dont un très volumineux occupait l'abdomen et qui pesait 815 gr. Le coenure fut identifié par ALLEN MC. INTOSH comme *Multiceps serialis theropitheci*.

Le cas que nous avons relaté ici est donc le cinquième signalé chez le babouin *Theropithecus gelada*. Dans les trois cas où la détermination spécifique a pu être établie il s'agissait de *Multiceps serialis*.

Ainsi que nous venons de le rappeler, SCHWARTZ a cru pouvoir créer une variété nouvelle parce qu'il ne réussit pas à infecter des lapins et des moutons au moyen d'oeufs de proglotis natures du ver adulte qu'il avait obtenu chez le chien.

P. A. CLAPHAM a singulièrement réduit le nombre d'espèces de Multiceps en se basant uniquement sur les mensurations statistiques des grands crochets. Il a examiné à un point de vue critique le matériel de 14 espèces nommées.

Se plaçant au point de vue morphologique strict il fait abstraction de la localisation tissulaire des larves et restreint même la signification de l'hôte définitif. Ainsi il admet que dans l'espèce *Multiceps multiceps* il puisse y avoir des souches différentes dont les formes larvaires peuvent présenter des localisation particulières correspondant à des développements cystiques différents..

Il ne sera peut-être pas suivi par ceux qui considèrent que pour caractériser l'espèce parasitaire le comportement biologique a une importance réelle, qui d'ailleurs peut retentir sur la localisation et jusqu'à un certain point sur la morphologie des formes larvaires.

Quoi qu'il en soit, et sans aller aussi loin que P. A. CLAPHAM, ce n'est pas parce que nous n'avons pas réussi ni à infester le chien, ni les rats au moyen des scolex des vésicules du coenure qui fait l'objet de cette note, que nous le considérons comme différent de *Multiceps serialis*.

Si nous suivions SCHWARTZ nous ne pourrions d'ailleurs pas l'identifier a

la variété qu'il a nommée *theropitheci* car les scolex vivant et paraissant avoir leur développement normal n'ont pas infecté le chien.

Pourquoi, dans ces condition, l'infestation des chiens ne s'est-elle pas produite? et pourquoi aussi les agneaux et les lapins ausquels l'auteur américain a fait ingérer les oeufs d'un proglotis mûr ne se sont-ils pas infectés des formes larvaires?

Nous n'essayerons pas de répondre à ces questions. A notre avis, seul la répétition de ces essais pourrait conduire à des conclusions définitives, comme seuls aussi des essais répétés d'infestation d'animaux divers pourront faire connaitre les hôtes définitifs de toute la série de *Multiceps* dont la seule forme larvaire a été décrite.

RESUME

Nous rapportons l'observation d'un cinquième cas de coenurose chez le babouin.

Le développement cystique à siege principal abdominal avait atteint le poids de 1980 grammes. Le nombre, le forme et les dimensions des crochets des scolex nous font rattacher le coenure à *Multiceps serialis* pour les formes larvaires desquelles le babouin se montre un hôte rèceptif et dans lequel elles atteignent des dimensions considérables.

Contrairement à SCHWARTZ, nous n'avons pas obtenu la forme adulte che trois chiens auxquels nous avions fait ingérer des vésicules portant des scolex.

RIASSUNTO

Gli AA. riferiscono sull'osservazione di un quinto caso di cenurosi nel babbuino.

Lo sviluppo cistico, a sede principale addominale, aveva raggiunto il peso di gr. 1980. Il numero, la forma e le dimensioni degli uncini degli scolici hanno fatto riferire il cenuro a *Multiceps serialis*, per le forme larvali del quale il babbuino si dimostra ospite recettivo, consentendone lo sviluppo fino a dimensioni considerevoli.

Contrariamente a SCHWARTZ gli AA. non hanno otenuto la forma adulta in tre cani cui erano state fatte ingerire vescicole portanti scolici.

SUMMARY

The authors report the observation of a fifth case of coenurosis in the babuin. The cyst, mainly localized in the abdomen, reached the weight of g. 1980. The number, form and size of scolices' hooks lead to consider this *Coenurus* as a specimen of *M. serialis* for whose larval forms the babuin is a receptive host permitting a considerable increase in size of the parasite. The authors did not succeed in obtaining adult forms from three dogs which had ingested vescicles bearing scolices, as opposed to SCHWARTZ's findings.

BIBLIOGRAPHIE

1) P. A. CLAPHAM. (1942): On identifying *Multiceps* spp. by measurement of the large hook. *Jl. of Helminth.*, *20*, 31.

2) J. H. SANDGROUND. (1937): On a coenurus from the brain of a monkey. *Jl. of Parasit.*, *23*, 482.

3) H. H. SCOTT. (1926): Report on deaths occuring in the Society's Garden during the year 1925, *Proc. Zool. Soc. of London*, 240.

4) B. SCHWARTZ. (1927): A Subcuntaneos tumor in a primate caused by tapeworn larvae experimentally reared to maturity in dogs. *Jl. Agr. Research.*, *35*, 471.

5) S. R. ELEK and L. E. FINKELSTEIN. (1939): *Multiceps serialis* infestation in a baboon. Report of a case exhibiting multiple connective tissue cystic masses. *Zoologica*, *26*, 323.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

LES LARVES LETHALES ET LEUR SIGNIFICATION DANS LE COMPLEXE *CULEX PIPIENS*

E. ROUBAUD (*)

L'ancienne entité spécificique *Culex pipiens* L. est aujourd'hui conçue comme une espèce collective renfermant plusieurs espèces ou sous-espèces, voire même des races secondaires, ou biotypes. Cette question a fait l'objet, principalement à la suite des publications que je lui ai consacrées, des préoccupations d'un assez grand nombre de chercheurs, au cours de ces dernières années. La question dépassant largement le cadre strict des points de vue de la nomenclature, je voudrais, à l'occasion de l'Hommage spécial rendu si justement par *Rivista di Parassitologia* au souvenir de l'illustre Zoologiste et Parasitologue B. GRASSI, qui a fourni tant d'apports de grande portée à l'histoire des Culicides, entre autres, traiter ici de cet intéressant problème. Je l'envisagerai surtout d'après des données qui semblent avoir échappé généralement à l'attention des investigateurs et dont il m'apparaît opportun de faire res sortir l'importance.

Les caractéristiques morphologiques étant le plus souvent de faible valeur au regard des particularités biologiques profondes qui permettent de différencier les divers éléments du complexe *pipiens*, il est nécessaire, pour bien juger le sujet, de définir, au préalable, le éléments essentiels qui peuvent intervenir utilement dans la différenciation spécifique ou sub-spécifique des diverses entités reconnaissables.

Je mettrai à part le complexe propre du *C. fatigans* qui est encore peu connu biologiquement et qui peut être morphologiquement différencié de celui du *pipiens*; malgré ses attaches évidentes avec ce dernier, il n'y a pas nécessité absolue de l'y confondre étroitement, ainsi qu'on a tendance actuellement à le faire. Il présente lui aussi son hétérogénéité biologique propre, manifestée par les variations dans l'orientation trophique des peuplements, ce qui

---

(*) *Institut Pasteur, Paris.*

laisse entrevoir également pour ce *Culex* l'existence d'une dissemblance génétique entre ses divers représentants.

Pour s'en tenir au complexe du *pipiens* proprement dit, pour le moment mieux connu, je rappellerai que du point de vue biologique j'en ai distingué trois entités essentielles qui sont dans l'aire d'habitat européen et mediterranéen: le *pipiens pipiens,* le *pipiens berbericus* et l'*autogenicus.* Les deux premières sont des Culex *anautogènes,* c'est-à-dire inaptes à se reproduire sans prendre de sang, tandis que les peuplements variés de l'*autogenicus* sont tous caractérisés par le pouvoir *autogène* inscrit dan le génotype.

Caractéristiques biologiques du « pipiens pipiens ».

Le *Culex pipiens pipiens* est le moustique commun rural bien connu. En dehors de l'anautogénèse, ses caractéristiques biologiques foncières sont: l'*eurygamie* ou nécessité d'un certain espace pour l'accouplement, l'*hétérodynamie* ou l'impossibilité de maintenir une activité hémophage et reproductrice toute l'année, certaine génération étant affectée de diapause ovarienne spontanée et d'engraissement autotrophe. Les individus ainsi affectés réalisent le type de l'hibernation complète, entendue au sens défini par B. GRASSI pour certains peuplements de l'*Anopheles maculipennis.* Enfin, il convient d'ajouter à ces différentes caractéristiques biologiques profondes, l'ornithophilie essentielle, les peuplements *actifs* du *pipiens pipiens* étant orientés très nettement, d'ordinaire, vers l'exploitation trophique des oiseaux. Certains cependant attaquent les chauve-souris, en milieu cavernicole.

Caractéristiques biologiques du « pipiens berbericus ».

Le *pipiens berbericus,* dont les peuplements sont méditerranéens, est anautogène comme le précédent mais il s'en différencie foncièrement au point de vue biologique. 1° - Ce Culex n'est pas à proprement parler eurygame, mais plutôt *sténeurygame.* S'il est possible d'obtenir, en effet, la reproduction des femelles en cages de 1/10 de mètres cube, les expériences ont montré que dans de telles conditions de faible espace, l'accouplement est difficilement obtenu.

C'est ainsi que dans mes élevages d'une souche de ce Culex, originaire du Midi de la France, j'ai pu noter qu'a à la 1ère génération née en captivité une dizaine de pontes fécondées seulement furent constatées sur une *centaine* de femelles.

A la 2e génération 5 seulement sur *plusieurs centaines* de femelles et de nombreux mâles.

A la 3e génération *aucune* ponte fécondée sur 35 femelles.

On voit donc que dans son comportement sexuel ce biotype est à la limite de la sténogamie définie pour un *espace nuptial* de 1/10 de m. cube. Ce comportement se rapproche très étroitement de celui que j'ai décrit (1948) pour

certain biotype de l'*Anopheles claviger* (*bifurcatus*). Il montre les mêmes fluctuations tendant progressivement vers l'eurygamie franche, que celles que j'ai observées chez cet Anophèle, au cours de la captivité. Nous verrons plus loin que chez le *pipiens pipiens* certaines souches manifestent aussi, d'ailleurs, une atténuation apparente de leur eurygamie, ce qui leur confère, à ce point de vue, des analogies incontestables avec le *berbericus*.

2° - Le *berbericus* se différencie plus profondément du *pipiens pipiens* par son *homodynamie*, c'est à dire par une activité hémophage et reproductrice théoriquement continue. Il n'existe pas chez ce moustique d'hibernation vraie, avec diapause ovarienne spontanée et engraissement autotrophe. Sa mise au repos, en hiver, est purement conditionelle et dépendante de la température. On peut, à conditions thermiques favorables, en obtenir des pontes en plein hiver.

3° - Le *berbericus* est caractérisé nettement par son orientation anthropophile franche. S'il est possible de l'alimenter sur des oiseaux, il est, dans la nature, franchement agressif pour les humains, au même degré et parfois davantage que l'autogène. En captivité on peut difficilement l'entretenir sur canaris: dans un essai, sur 35 femelles, 4 seulement se gorgèrent sur l'oiseau, dans trois autres essais sur plusieurs centaines de femelles aucune n'a pu prendre de sang; alors que l'attaque de l'homme est rapide et beacoup plus facile même que pour l'autogène.

Le *Culex autogenicus* Roub. est un moustique éloigné des précédents 1° - par sa *sténogamie* vraie qui est très étroite, la reproduction pouvant s'effectuer dans un espace des plus réduit, en tubes de verre. 2° - par sa reproduction *autogène*, qui s'effectue, à la première ponte, sans le secours de sang ingéré: Il se rapproche par contre du *berbericus* par son *homodynamie* essentielle. Il n'existe pas non plus, en effet, chez ce Culex, da phase hibernale vraie, mais uniquement un ralentissement évolutif conditionnel. A température favorable il n'est jamais frappé d'arrêt spontané dans sa reproduction.

Enfin son orientation *anthropophile* permet, ainsi que l'homodynamie, de le rapprocher du biotype *berbericus;* toutefois, et je dois insister sur ce point, sur lequel, d'ailleurs, je reviendrai plus loin, *elle ne saurait à elle seule, en aucune manière, suffire à le caractériser comme espèce ou sous-espèce distincte* dans le complexe du *pipiens*.

J'ajouterai que la présence ou l'absence de taches noires à la face ventrale du corps m'a permis de distinguer deux types principaux de peuplements chez l'*autogenicus*, le sous-type *sterno-pallidus* étant dépourvu de ponctuations ventrales abdominales, tandis que le *sterno-punctatus* en présente. Si l'on élève au rang d'espèce le biotype *autogenicus* qui se montre nettement séparé des autres représentants du complexe, par son mode de reproduction et sa sténogamie, on voit que deux sous-entités raciales, au moins, sont différenciables dans le groupe de l'autogène.

Ces diverses entités, encloses dans le complexe du *pipiens* étant ainsi dé-

finies, il est intéressant de se demander maintenant quelle est leur valeur respective, au point de vue génotypique, dans l'ensemble du complexe. La méthode des intercroisements apporte ici, comme nous allons le voir, des arguments positifs en faveur de l'individualité des types distingués.

Les larves léthales dans les pontes et leur signification.

La stérilité des pontes a été fréquemment observée (Marshall 1938, Laven 1951 etc.) à la suite des croisements entre divers représentants ou souches du groupe *pipiens*, depuis mes premières observations (1933) touchant l'autogéne et l'anautogène. Mais le *modus* apparent de la stérilité en a le plus souvent échappé.

Lorsqu'on étudie microscopiquement, quelques jour après l'éclosion, les pontes d'une souche quelconque de Culex du groupe *pipiens*, on y observe très généralement le présence, en quantité très variable, d'oeufs renfermant de



Fig. 1. - *C. pipiens*, larve léthale dans l'oeuf. X 70 env.

petites larves qui ont échappé à l'éclosion. Si l'on surveille leur élevage, on constate qu'elles meurent enfermées à l'intérieur du chorion de d'oeuf, sans parvenir jamais à se développer. J'ai donné à ces larves le nom de larves léthales et je les interprète comme l'expression d'influence amixiques s'exercant, à la suite d'un intercroisement racial ou spécifique, entre deux éléments hétérologues du complexe. L'observateur allemand E. Ulmann (1941) semble avoir été le premier à discerner l'existence d'oeufs et de larves bloqués dans certaines pontes de Culex autogènes; il en a donné de bonnes figures et montré leur

importance dans la réduction des peuplements: toutefois il ne s'en est point expliqué la nature et n'a pas tenté de le faire.

J'ai observé et étudié systématiquement depuis une quinzaine d'années ces larves correpondant à des ratés d'éclosion dans les barquettes de ponte de nombreuses souches de *Culex*, savoir: une dizaine de souches *pipiens pipiens* provenant de différentes régions de France, Angleterre, Belgique, une souche de *berbericus* originaire de la ville d'Arles, en Provence, 21 souches d'*autogenicus* provenant de régions diverses de l'Europe et de l'Afrique du Nord. Je préciserai notamment que pour le *berbericus*, jusqu'ici peu étudié, du Midi de la France, la 6e ponte d'une même femelle entretenue depuis deux mois au laboratoire a présenté 17 oeufs à larves léthales sur 25 oeufs pondus. Je me borne ici à noter le fait; j'y reviendrai plus loin. Je donne ci-après un exemple des proportions observées de larves léthales dans différentes souches autogènes.

TABLE 1

Nombre des larves léthales observées dans différentes souches, naturelles ou non, d'autogènes.

Souche	Nombre d'oeufs	Nombre de larves léthales	Indice léthal
Souche autogène parisienne Blanc – Mesnill	**2889**	**86**	**0,029**
S. autogène Tunis	**1512**	**220**	**0,14**
Croisement: autogène française × autogène Alger	**1072**	**103**	**0,09**
S. autogène St. Hélène (naturelle)	**407**	**12**	**0,039**
Croisement: S. St. Hélène ♂ × S Blanc Mesnil ♀	**136**	**32**	**0,23**
Croisement: S. St. Hélène ♂ × S. Tunis ♀	**241**	**20**	**0,08**
Croisement: autogène parisien ♂ × S. Tunis ♀	**869**	**301**	**0,34**

Nature physiologique du blocage des pontes chez les Culex.

Lorsqu'on se trouve en présence de ces larves primaires de Culex bloquées dans l'oeuf, sans pouvoir parvenir à l'éclosion, la première idée qui vient à l'esprit est de les assimiler à des larves en diapause, comme les pontes des Aëdinés, au sens large, en offrent un exemple bien connu. S'il en était ainsi, il y aurait lieu d'assimiler les oeufs de Culex renfermant des larves léthales à des oeufs *dormants*, c'est à dire à des oeufs renfermant des larves primaires en condition d'asthénobiose par l'effet d'influences de fatigue physiologique.

C'est ainsi que j'ai pu, naguère, déceler l'existence d'oeufs *dormants* inha-

bituels dans les pontes d'*A. claviger* var. *petragnani* Del Vecchio. Comme les oeufs d'Aëdinés, ces oeufs *dormants* d'Anophèle se montrent, partiellement au moins, réactivables par des excitations physiques (agitation) ou chimiques. Mais, parfois, beaucoup d'entre eux ne sont pas ramenés à l'éclosion par ces influences et leur blocage apparaît alors définitif, comme celui des pontes bloquées des Culex. Par ailleurs, j'ai pu montrer que la dormance des oeufs de l'*A. claviger* ne se manifeste plus si les femelles mères sont soumises pendant quelques jours, avant leur ponte, à une hibernation artificielle à 6-10°C. Ce fait permet de vérifier et de tenir pour certain que la diapause larvaire affectant les oeufs dormants du *claviger* représente un effet de fatigue physiologique hérité des parents. En « rajeunissant » la femelle pondeuse par le froid, on libère sa descendance immédiate des effets plus ou moins mortels de la torpeur d'asthénobiose.

Il était naturellement permis de se demander si les larves primaires bloquées des oeufs de *Culex* ne réagiraient pas physiologiquement de la même manière que les larves asthéniques en diapause des oeufs d'Aëdinés et des oeufs dormants d'*Anopheles claviger*. Mais les recherches que j'ai poursuivies sur ce sujet indiquent que les analogies avec ces larves en diapause ne sont que lointaines et que les effets réactivants, positifs chez les larves en diapause précédentes, ne sont pas efficaces généralement pour obtenir le rappel à l'activité des larves léthales de Culex.

Les expériences ont montré, en particulier, que les effets de choc et d'agitation, si capables de déclencher des éclosions massives chez les oeufs latents d'Aëdinés, sont généralement sans effet bien marqué sur les pontes bloquées des Culex. Cependant il est parfois possible d'obtenir des éclosions partielles, en soumettant ces pontes à des excitations artificielles. C'est ainsi que les pressions exercées sur la coque, entre lame et lamelle, ou à l'aide d'une aiguille lancéolée, permettent parfois de libérer les larves léthales de leur chorion. Les résultats sont naturellement d'autant plus nets que l'époque où l'on fait agir l'excitation se rapproche de la date d'éclosion normale, différée seulement de quelques jours, ainsi que l'expérience suivante le montre.

Le 1 mars 1936 j'ai obtenu d'un élevage d'autogène de Tunis une vingtaine de barquettes de ponte. A l'examen direct pratiqué le 3, elles se sont montrées riches en larves bloquées. Certaines pontes en sont presque entièrement constituées.

Sur environ 300 oeufs n'ayant pas libéré de larves, des excitations directes par pressions et frottements sont réalisées et les oeufs placés à 25°C. Du 3 au 6 mars, 45 larves actives sont dénombrées. Le 6 mars, 57 oeufs renfermant des larves non écloses sont excités par pressions légères entre lame et lamelle,, puis replacées à la surface de l'eau. Quelques heures plus tard, dans l'après-midi 4 jeunes larves actives sont dénombrées; 10 autres se montrent partiellement écloses mais n'ont pu se dégager entièrement de la coque de l'oeuf.

A la suite de cet essai d'éclosion artificielle on compte encore, les jours suivants, sur un total de 435 oeufs examinés, 109 oeufs renfermant des larves léthales ayant résisté aux influences mécaniques d'éclosion.

En soumettant les pontes bloquées des Culex à une excitation chimique violente, comme l'action directe de l'alcool à 90°, on peut de même provoquer des éclosions chez certaines des larves à évolution suspendue. Par exemple, une ponte autogène du 20 sept. et chez laquelle, à l'examen direct, 18 larves léthales furent constatées le 26, a été immergée dans l'alcool le 27. Deux éclosion de larves animées de mouvements très faibles furent alors obtenues, démontrant que certaines des larves primaires affectées d'incapacité évolutive ultérieure et par suite condamnées à mourir à l'intérieur de l'oeuf peuvent demeurer en vie latente pendant au moins une semaine après la ponte.

Il peut arriver exceptionnellement que dans une ponte affectée en quasi totalité d'incapacité évolutive un petit nombre de larves parviennent à une éclosion spontanée et même à un développement partiel ultérieur. Ce fait, quoiqu'exceptionnel, est intéressant à étudier de près. Il permet d'expliquer certains retards évolutifs spontanés marqués dans les élevages par certaines larves d'apparence normale mais qui se montrent affectées d'une évolution languide.Je donnerai de ce fait les exemples ci-après:

1° - Une ponte est obtenue par voie autogène le 20 sept. Elle compte 37 oeufs, lequels ne libèrent en éclosion spontanée qu'une seule larve, le 25 sept. Les 36 oeufs restants se montrent bloqués et l'on compte parmi eux, le 26 sept., 18 larves léthales et 18 oeufs clairs eu embryonnès, morts sans évolution ultérieure. De cette ponte quasi entièrement bloquée, une larve unique a donc pu être obtenue d'éclosion, le reste de la ponte se montrant pratiquement stérile.

La larve unique, mise en élevage à 25° C. avec un aliment abondant, riche en matières protéiques (poudre de soja)), s'accroît lentement. Elle meurt au IVe strade, le 20 Oct. après environ un mois d'âge, sans avoir pu se nymphoser.

2° - Une ponte de 20 oeufs est obtenue le 18 sept. d'une ♀ *autogenicus*, après repas de sang. De ces 20 oeufs éclosent, le 20 sept, 12 larves par éclosion spontanée. Les huit oeufs restants, inaptes à l'éclosion, montrent 6 larves léthales et 2 oeufs clairs. Les 12 larves écloses, élevées ensemble à température du laboratoire et à la poudre de soja, accusent tres vite une inégalité de croissance marquée. Le 27 sept., trois d'entre-elles ont atteint le deuxième âge et mesurent 8 mm. de long; une troisième qui a également mué, mesure 5 mm., alors que les six autres larves n'ont pas encore dépassé le stade I.

Le 2 octobre, 4 de ces larves, encore au stade I, ne dépassent pas 1 mm. de long, alors que 3 des larves les plus avancées sont passées au stade IV. Les deux larves restantes sont mortes.

Le 7 octobre 2 nymphes sont obtenues; parmi les petites larves *deux* demeurent encore au 1er stade, les autres sont mortes.

Le 11 Octobre l'èlevage ne comprend plus,, à l'état vivant, qu'*une nymphe*, une grosse larve au stade IV et 2 petites larves au 1er stade. Le 13, la nymphe éclôt, donnant un ♂ normal, la larve au IVe stade se nymphose et donne une ♀ le 19 Oct. Des deux petites larves demeurées au strade I depuis le début (20 Sept.) une est encore en vie le 13 Oct. et meurt le 14.

On voit donc que des larves issues d'une ponte en majorité bloquée peuvent être, malgré leur éclosion spontanée, affectées d'un très faible potentiel d'activité métabolique. Certains se maintiennent à l'état de larves primaires, pendant

de longues semaines sans évoluer, jusqu'à leur mort; d'autres, si elles évoluent, ne le font que partiellement, la plupart meurent avant de libérer des imagos normaux.

Si j'ai insisté sur ces exemples c'est qu'ils montrent que l'inaptitude évolutive dans les pontes plus ou moins fortement bloquées peut dépasser le stade des larves primaires léthales qui meurent dans l'oeuf et se manifester même sur des larves qui ont réussi à se libérer de la coque de l'oeuf. La léthalité peut se traduire alors à un stade plus ou moins avancé de l'évolution larvaire, de même qu'elle atteint aussi les oeufs et les embryons au début du développement, dans les pontes affectées du caractère léthal. Il existe en effet presque toujours, dans les pontes bloquées des Culex, un plus ou moins grand nombre d'oeufs embryonnés, morts en cours de développement, comme l'a bien vu Ulmann.

Pour en revenir à ce qui a été dit plus haut du comportement des larves affectées de léthalité, soit dans l'oeuf avant l'éclosion, soit après l'éclosion, on voit que l'inertie métabolique caractéristique des individus atteints n'est pas sans rapports, en apparence, avec les processus d'asthénobiose ou de ralentissement évolutif spontané (diapauses) qui affectent tant d'arthropodes au cours de leur developpement. Entre un oeuf de Culex renfermant une larve léthale et un oeuf dormant d'Aëdiné renfermant une larve primaire en diapause, l'analogie est frappante; de même, il y a une certaine analogie entre des larves en diapause d'*Anopheles claviger* ou d'*A. plumbeus* qui, en cours de développement, demeurent en état ralenti pendant des semaines, et les larves ralenties jusqu'à la mort de nos Culex autogènes, lorsqu'elles parviennent à franchir exceptionnellement la barrière de l'éclosion.

Toutefois, ces analogies dans l'inertie évolutive ne sont sans doute qu'apparentes. En fait, l'incapacité d'évolution qui frappe nos larves léthales de Culex est, physiologiquement, tout à fait distincte de celle qui affecterait des larves en condition d'asthénobiose ou de diapause vraie. La différence essentielle est marquée par le fait qu'il a été, jusqu'ici, impossible de *réactiver* les véritables larves léthales. Leur torpeur est irréversible et fatale. Elles n'obéissent point aux influences de rappel métabolique et sont appelées à mourir, à échéance plus ou moins lointaine, sauf exceptions très rares. L'incapacité évolutive se montre chez elles franche et définitive d'emblée, alors que chez les oeufs ou les larves qui sont simplement en diapause, l'inertie peut être généralement brisée, sous l'effet des excitants divers de réactivation agissant en temps utile, ou simplement sous l'action prolongée du froid. En particulier, si, comme il a été dit plus haut, la production d'oeufs dormants, chez les femelles d'*A. claviger*, cesse lorsque ces femelles-mères sont soumises à une athermobiose de quelque durée, il n'est pas apparu que ces mêmes influences soient susceptibles de faire disparaître la production des larves léthales chez les femelles de Culex, lorsque celles-ci sont aptes à en produire. En faisant

intervenir l'action du froid soit sur des larves en cours de developpement soit sur des femelles d'autogènes avant la ponte, je n'ai constaté aucune différence par rapport aux témoins, dans la proportion des larves léthales.

Inactivité des influences extérieures sur la production des larves léthales.

Il serait permis de supposer que ces phénomènes de léthalité dont l'expression la plus apparente consiste dans l'incapacité d'éclosion des larves primaires, ne sont que l'expression de mauvaises conditions de développement, ou d'interventions pathologiques extérieures. Mais des observations poursuivies depuis quinze ans sur ce phénomène de l'inactivité des pontes de *Culex* ne m'ont jamais permis de les situer en corrélation avec de telles influences. D'un élevage à l'autre, où les conditions sont identiques, il existe souvent de grandes différences dans le nombre des mêmes larves produites pour un chiffre de pontes semblable. Les différences sont également acquises, à ce point de vue, entre les pontes de deux femelles soeurs ou entre les pontes des générations succesives d'une même lignée.

L'irrégularité avec laquelle se manifestent dans les pontes les phénomènes du blocage, son inconstance au cours des élevages ne permettent pas, en particulier, de les subordonner à des influences d'infection parasitaire ou microbienne, comparables aux intéressants phénomènes de virose notamment observés chez les Drosophiles sensibles au CO^2 par Lheritier et ses collaborateurs. Seules les interférences d'ordre génétique et nous allons y revenir se présentent comme devant être fondamentalement retenues dans le déterminisme du phénomène.

J'indiquerai aussi, avant d'aborder cette question, que si l'on étudie dans une même souche de *Culex* les proportions relatives de larves léthales apparues au cours des pontes successives, cette proportion échappe à toute régularité de progression. Certaines souches qui, à l'origine, semblent à peu près dépourvues de larves bloquées, en voient apparaître par la suite et inversement. Ainsi une souche *sterno-punctatus* d'autogène d'Arles n'accusait, au moment de sa capture en sept. 1943, sur 707 oeufs pondus, que 3 larves léthales, alors que le 14 Juin 1944 après environ 9 mois d'élevage, on dénombrera sur 207 oeufs, 57 larves léthales.

On pourrait penser que l'âge des femelles influe sur leur production de pontes léthales, mai, par la suite, une numération effectuée les 20 juin et 1 juillet de la même année ne fera ressortir, sur 8 pontes examinées de la même souche, aucune larve bloquée.

Au cours de l'élevage de l'anautogène *berbericus* du Midi de la France, sur un total de 293 oeufs produits par une même femelle, du 12 Oct. au 8 Déc. en cinq pontes successives, aucun oeuf léthal ne fut décelé, alors qu'à la 6e ponte 17 larves léthales furent produites sur 25 oeufs.

Les conditions alimentaires des femelles ne paraissent pas intervenir dans

la production des oeufs bloquées. Chez les Culex autogènes, notamment, l'apparition des larves léthales dans les pontes ne semble pas influencée par les repas de sang. J'ai cherché à comparer chez le *berbericus* d'Arles la production des larves léthales par des femelles nourries respectivement sur l'homme et sur l'oiseau (canari). Le résultat de l'élevage au sang humain nous est fourni par la femelle précédente. Deux autres femelles nourries sur canaris ont donné pour l'une d'entre-elles 300 oeufs environ sans larves léthales, au cours de 3 pontes successives, pour l'autre 15 larves léthales à la 4e ponte, aucune larve léthale à la 5e. Il n'apparaît donc pas que l'alimentation au sang d'oiseau qui pourtant est difficilement acceptée par ce type de Culex, exerce une influence plus préjudiciable que celle du sang humain sur la destinée évolutive des oeufs produits.

Influence des intercroisements dans la léthalité.

Les expériences ont montré que les larves léthales dans les pontes des Culex de l'ensemble *pipiens* sont avant tout, sinon exclusivement, l'expression d'influences amixiques qui réfrénent plus ou moins fortement les possibilités d'intercroisement entre les divers représentants spécifiques ou subspécifiques du complexe. En intercroisant les souches ou types divers, on voit apparaître les manifestations du blocage soit dans un sens, soit dans l'autre du croisement, parfois dans les deux. C'est ainsi qu'en intercroisant (Roubaud, 1941) ♂ *sterno-punctatus* et ♀ *sterno-pallidus* chez le Culex autogène, je n'ai observé aucune influence inhibitrice, tandis que dans le sens inverse toutes les pontes sont demeurées stériles, quoique fécondées. Elles se montrent alors constituées par des oeufs embryonnés arrêtés dans leur développement ou des larves léthales encloses dans les coques ovulaires. Sur des centaines d'oeufs fécondés selon ce mode de croisement, il n'a pas été possible d'obtenir un seul développement d'hybrides viables. Les mâles *autogenicus sternopallidus* introduisent dans le biotype ponctué de l'autogène des facteurs d'incompatibilité physiologique appelés à perturber gravement l'évolution des peuplements du moustique autogène. Les ratés dans les éclosions qui obèrent lourdement la descendance des moustiques de ce type ne dépendent pas de l'insuffisance des géniteurs, ceux-ci étant choisis parmi les moustiques ayant fourni des pontes normales.

Dans mon laboratoire S. Ghelelovitch (1952) a constaté que les croisements entre deux souches d'autogènes provenant l'une de Paris, l'autre de Hambourg, sont stériles dans les deux sens, tandis que les croisements entre la souche de Hambourg et une souche originaire de Tunis sont fertiles. L'absence de proportions mendéliennes simples dans la répartition de la stérilité dans chaque ponte, la grande variabilité des manifestations de ce caractère, rendent difficile son interprétation. Les expériences poursuivies par l'observateur ci-dessus l'ont amené à penser que le facteur de léthalité n'est pas de nature chromosomique, mais dû à l'incompatibilité cytoplasmique des souches en

présence. Pourtant, j'objecterai à cette conception, la permanence indéfinie des pontes léthales dans des élevages maintenus strictement à l'abri des mélanges d'intercroisement exogène. Il faudrait admettre et c'est, d'ailleurs, je pense, l'opinion de S. Ghelelovitch que la stérilité des pontes est déterminée héréditairement et transmise par le cytoplasme à écheance variable.

Quelle que soit la nature et le mécanisme d'action, sul lequel je ne saurais m'étendre ici, de ces curieux processus de léthalité qui affectent les populations de Culex du groupe *pipiens,* on peut affirmer, à mon sens, que la constatation de lerves léthales dans les pontes d'une lignée donnée de Culex traduit l'hybridation proche ou lointaine de cette lignée. Or, l'existence de telles larves a été constatée par moi dans toutes les souches de mes élevages étudiées, à ce point de vue, depuis une quinzaine d'années, qu'il s'agisse de *C. pipiens pipiens, C. berbericus, C. autogenicus.* Il me semble donc permis d'en inférer qu'aucun des peuplements naturels correspondants n'était exempt de mélanges avec d'autres types. Il apparaît vraisemblable que dans la nature, il n'existe guère, à l'heure actuelle, de lignées véritablement pures, c'est à dire exemptes de processus d'intercroisement avec des souches génétiquement différentes du même complexe. S'il est possible de distinguer spécifiquement ou subspécifiquement, en s'appuyant avant tout sur les particularités physiologiques des divers types, plusieurs entités définies dans l'espèce collective *Culex pipiens,* il faut reconnaître que, malgré les différences importantes et génétiquement stables qui les séparent, des possibilités de mélange subsistent constamment entre-elles, dans les zones géographiques, apparemment très étendues, où les types divers coexistent. Ces mélanges se traduisent d'ailleurs par les variations d'ordre morphologique observées, par exemple, chez le *pipiens pipiens,* comme chez les autogènes, tant dans la longuer des palpes que dans la ponctuation ventrale. Ils se traduisent également par certaines modifications appréciables dans les particularités biologiques les moins profondément fixées des représentants du groupe. Ainsi voyons-nous, dans certaines souches de *pipiens pipiens,* l'eurygamie habituelle du type s'atténuer légèrement, pour laisser apparaître une sténogamie relative, permettant la reproduction de certains individus en espace assez restreint, comme des cages de 1/10 m^3. De telles souches deviennent alors *sub-sténogames* au *sténeurygames* (Roubaud 1948) en apparence, bien que l'observation attentive montre que tous les individus ne réagissent généralement pas dans ce sens, mais seulement certains d'entre-eux, en proportion plus ou moins élevée selon les souches et qui masquent ainsi dans les élevages l'eurygamie rituelle.

On peut voir aussi affectée de certaines variantes l'*orientation trophique* des souches: aptitude à piquer l'homme ou les Mammifères (chauves-souris) chez l'anautogène *pipiens-pipiens,* habituellement ornithophile; exacerbation, au contraire, chez l'autogène de ses tendances à l'attaque de l'homme. Chez certains peuplements de ce moustique l'agressivité pour l'homme se montre souvent faible, alors qu'elle reprend d'ordinaire un degré plus élevé à la suite des croisements,

avec d'autres souches (Roubaud, 1933) (*). Peut être également verrait-on varier, à la suite des mélanges génétiques, la sensibilité relative des divers types de *Culex* du groupe *pipiens*, à l'infection par les *Plasmodium* des oiseaux. Nous avons montré (1934) avec J. Mezger que le *C. pipiens* ornithophile a une sensibilité plus grande que l'autogène à ce point de vue. Il est possible que les mélanges entre les deux types de Culex modifient leurs aptitudes relatives à subvenir à l'évolution plasmodienne. Des recherches seraient à poursuivre dans ce sens.

Ces variations de comportement imputables aux interférences génétiques entre les types se limitent à des particularités plutôt secondaires; elles n'intéressent pas les particularités physiologiques *essentielles* des *Culex* en cause. Ainsi, l'anautogénèse chez les *Culex* anautogènes (*pipiens-pipiens*, *berbericus*), le pouvoir autogène chez les biotypes divers de *Culex autogenicus* ne paraissent pas se ressentir des effets lointains d'hybridation possibles; il en est de même pour les manifestations d'hétérodynamie ou d'homodynamie, c'est à dire respectivement de l'existence d'une diapause ovarienne spontanée dans les peuplements- types de *pipiens-pipiens*, et de l'absence spécifique d'une telle diapause dans les peuplements-types d'*autogenicus* et de *berbericus*.

A bien considérer les choses, on peut dire que les effets de léthalité résultant des mélanges génétiques chez les Culex sont aussi sensibles et peut être même davantage, lorsque les intercroisements n'intéressent que des biotypes secondaires, que lorsqu'ils affectent des espèces ou sous-espèces bien caractérisées. Par exemple les mélanges entre les deux types d'autogènes que nous avons caractérisés sous les qualificatifs de *sterno-pallidus* et de *sterno-punctatus*, qui ne diffèrent que par la seule présence ou l'absence de ponctuations écailleuses à la face ventrale de l'abdomen, aboutissent à des effets de léthalité dont on peut apprécier plus loin l'extraordinaire importance. Ils sont au moins aussi considérables que ceux l'on peut relever au cours des intercroisements de *C. pipiens pipiens* avec *C. autogenicus* ou même avec *C. fatigans*.

(*) On voit par là que s'il est justifié d'attribuer une certaine importance à l'orientation trophique pour définir un type biologique de *Culex*, ce caractère à lui seul est insuffisant pour permettre de l'identifier en tant qu'espèce. Il faut pour celà, ou bien faire appel à des caractéristiques morphologiques indiscutables et constantes ou bien relever l'ensemble des particularités biologiques essentielles du biotype. Aussi ne pouvons-nous nullement souscrire aux vues des Entomologistes britanniques qui, avec Marshall et Staley (1937), Jobling (1938) etc. identifient le moustique autogène au *Culex molestus*, différencié par Forskal en Egypte, d'après son agressivité pour l'homme, en 1785. Comme nous ne savons rien d'autre su ce *Culex molestus*, que certains, d'autre part, assimilent à *C. laticinctus*, il serait imprudent de le rapporter d'autorité au Culex autogène et nous ne suivons point les nomenclateurs qui se satisfont de ce point de vue simpliste et arbitraire. Il est tout à fait insuffisant de caractériser l'*autogenicus* d'après le seule anthropophilie.

Les influences amixiques et la réductions spontanée des populations de Culex.

Les phénomènes d'amixie résultant de l'intercroisement de ces types bien définis, qui se présentent avec la valeur réelle d'espèces, sont effectivement très importants; pourtant ils ne le sont pas plus que ceux qui intéressent les mélanges entre-eux de souches raciales d'une même espèce comme l'autogène.

Ainsi, dans divers essais, sur une ponte résultant d'un croisement de mâles *pipiens pipiens* de Normandie avec des femelles de *Culex* autogène de souche tunisienne, j'ai montré (1941) que *trois* furent infertiles totalement, malgré la fécondation contrôlée des femelles. Dans la combinaison inverse, ♂ *autogenicus* Tunis × ♀ *pipiens pipiens* Normandie, les trois pontes obtenues étaient toutes les trois frappées de léthalité (1).

De même, dans la combinaison d'intercroisement ♂ *pipiens* × ♀ *fatigans*, sur *cinq* pontes obtenues, *deux* furent entièrement stériles ou ne produisirent que quelques larves léthales. Sur plus de 300 oeufs produits par des femelles de *fatigans*, toutes reconnues fécondées par des mâles *pipiens*, 55 moustiques hybrides parvinrent seuls à l'éclosion. Dans la combinaison inverse, sur 17 pontes de femelles reconnues fécondées, 16 furent entièrement stériles. Sur 850 oeufs issus du croisement mâle *fatigans* × femelles *pipiens pipiens*, seulement deux moustiques hybrides F furent obtenus. Ces exemples accusent l'importance des phénomènes d'amixie limitant les mélanges entre espèces bien définies de *Culex;* mais les effets de léthalité sont aussi intenses et parfois plus, lorsqu'ils portent sur de simples types raciaux de l'autogène.

Par ailleurs, les phénomènes de léthalité survenus comme conséquence de mélanges interraciaux on interspècifiques et qui s'expriment soit au cours du développement dans l'oeuf, soit même au cours de la vie ultérieure, ainsi que nous en avons donné plus haut des exemples, lorsque certains degrés d'évolution peuvent encore se manifester au-delà de l'oeuf, réduisent considérablement la portée de ces mélanges.

Les influences de stérilité que nous attribuons à l'intercroisement des génotypes divers constituent certainement, en même temps qu'une limite considerable, aux possibilités de mélange des divers types spécifiques ou subspécifiques, un facteur important de réduction spontanée, dans la nature, des souches de Culex considérées, sur le quel il est important d'attirer l'attention. J'en ai donné des exemples en étudiant, à ce point de vue, certains peuplements de l'autogène parisien. D'une souche recueillie à Paris, et constituée par des mâles du type *sterno-punctatus* et des femelles en majorité non ponctuées (*sterno-pallidus*), sur 2016 oeufs déposés dès la première génération de capture, 494

---

(1) L'existence du Culex autogène vrai en Tunisie, manifestée au cours de ces essais publiés en 1941, m'était connue depuis beaocoup plus longtemps, bien que je n'aie pas eu l'occasion de le relater. Plus récemment, M. Vermeil (1952) en a découvert et fait connaître plusieurs origines tunisiennes.

furent affectés de léthalité. Une souche autogène provenant de Compiègne a produit dans les mêmes conditions, 447 oeufs non viables pour 593 pondus. Etudiant, avec S. Ghelelovitch (1950) trois souches provenant l'une de Seine et Oise, l'autre de l'Oise, la troisième de sud de la Corse, nous avons noté que sur 39 pontes obtenues de l'ensemble de ces souches, 17 furent entièrement fertiles, 15 partiellement et 7 entièrement stériles. Ces exemples suffisent à faire ressortir la profonde influence limitante du conflit sexuel existant entre les deux races autogènes en cause.

* * *

En définitive, on voit que le groupe *pipiens* comporte un faisceau d'espèces ou de sous-espèces qui ne peuvent être bien différenciées, pour le moment, que par l'ensemble de leurs particularités physiologiques ou biologiques. Espèces en formation, dont la séparation en tant qu'entités définies est en principe d'autant plus aléatoire, que les affinités sexuelles demeurent à peu près intactes entre les divers éléments du complexe. Si l'attraction sexuelle subsistante tend à porter les unes vers les autres les populations différenciées de cet ensemble, les phénomènes d'amixie, dont nous avons tenté de montrer l'importance, sont là pour restreindre singulièrement la portée des interférences possibles entre des types par ailleurs génétiquement distincts. La léthalité ovulaire et larvaire qui résulte directement, ou à échéance plus ou moins lointaine des mélanges sexuels éventuels, intervient ainsi comme un régulateur puissant des différentes entités du complexe. Toutefois, l'amixie régulatrice, si elle parvient à maintenir la différenciation génétique telle qu'elle nous apparaît actuellement réalisée parmi les représentants du complexe, ne le fait pas sans aléas pour ces derniers: elle inflige constamment au complexe culicidien en cause, des pertes singulièrement élevées.

C'est là un aspect-type du conflit sexuel permanent qui oppose entre-eux les représentants divers de cette grande famille culicidienne que constitue le complexe du Moustique commun.

Tout se passe en somme, comme si l'introduction d'un génotype différent dans un autre exerçait sur ce dernier une action toxique ou limitative comparable, dans une certaine mesure, aux effets lointains d'un parasitisme profond.

RESUME

L'Auteur rappelle les constituants principaux du complexe *C. pipiens* L. tels qu'il a pu actuellement les définir, au moins dans l'aire d'habitat européen et africain du moustique commun, à l'exclusion de *C. fatigans*. Trois entités majeures, espèces ou sous- espèces, peuvent être distinguées:

1°) Le Culex rural *pipiens pipiens*, anautogène, eurygame (parfois sténeurygame), hétérodyname et d'ordinaire ornithophile, bien que s'attaquant aussi aux chauves-souris en milieu cavernicole.

2°) le *pipiens berbericus*, sous-espèce du précédent, anautogène, sténeurygame, homodyname et *puissamment anthropophile.*

3°) le *C. autogenicus*, autogène, strictement sténogame, homodyname et plus ou moins anthropophile. Il s'agit en fait d'une espèce différenciée morphologiquement et biologiquement, dans laquelle sont perceptibles des peuplements raciaux secondaires, à ponctuation ventrale ou non (*sternopunctatus* et *sternopallidus*) ou diverses variations stabilisées de la coloration nymphale, la chétotaxie etc.

Bien que les affinités sexuelles persistent entre ces divers éléments de l'espèce collective *C. pipiens* L. et même avec *C. fatigans*, leurs intercroisements révelent l'existence d'effets d'amixie plus ou moins sévères, traduits par la production de pontes partiellement ou même entièrement stériles, chez les femelles fécondées par mâles d'un autre type, ou même d'une souche différente. La stérilité n'est pas due au manque de fertilisation, mais bien à une incapacité évolutive frappant soit certains oeufs en cours développement, soit surtout les larves primaires, en totalité ou en partie, avant l'éclosion. Ces *larves léthales* meurent encloses dans le chorion. S'il est parfois possible d'en provoquer artificiellement l'éclosion, par effets mécaniques ou chimiques, on constate que l'évolution ultérieure reste le plus souvent bloquée. Seuls de très rares individus parviennent à un développement lent et difficile. L'inaptitude à une réactivation effective différencie donc les larves léthales de Culex des larves en diapause dans l'oeuf, fréquentes chez divers Culicides (Aëdinés).

La production d'oeufs à larves léthales a été observée par l'A. dans toutes les souches naturelles étudiées (une trentaine), autogènes ou anautogènes. Les expériences ont montré que cette production est indépendante des conditions extérieures, de l'alimentation, des actions de viellissement etc. Elle représente un fait d'incompatibilité physiologique, de nature chromosomienne ou cytoplasmique, entre génotypes différents du complexe *pipiens*. La présence de larves *léthales* dans les pontes d'une souche donnée, naturelle ou artificielle, constitue donc le test d'une interférence antérieure de cette souche avec un autre représentant hétérozygote de la famille. La quasi-constance du phénomène permet de penser que, dans la nature, il n'existe vraisemblablement pas, à l'heure actuelle, de souche génotypiquement pure d'un type quelconque de *pipiens*, sauf peut être dans des régions géographiquement ou localement très circonscrites.

Les mélanges d'hybridation qui malgré les influences sévères de léthalité signalées demeurent possibles entre les représentants divers de la famille, peuvent introduire certaines variantes secondaires dans leurs caractéristiques morphologiques ou biologiques respectives. Mais ces effets modificateurs sont puissamment réfrénés par les influences régulatrices rigoureuses attachées aux interférences sexuelles. La dure loi de léthalité qui pèse sur les intercroisements possibles, en limite essentiellement la portée. Les larves léthales observables dans les pontes des diverses espèces ou sous-espèces du *pipiens* doivent apparaître comme l'expression directe du conflit sexuel permanent qui oppose entre eux les divers génotypes. Chacun des éléments différenciés du complexe représente, à ce point de vue, pour les autres, un facteur de perturbation biologique redoutable, par les effets léthaux que son interférence sexuelle est susceptible d'engendrer. L'amixie régulatrice, en même temps qu'elle freine les mélanges génétiques entre les divers peuplements de Culex intervient, en définitive, dans la nature, comme un puissant facteur de réduction spontanée, au sein de cette curieuse mosaïque familiale que représente le complexe du moustique commun.

RIASSUNTO

L'A. illustra i costituenti principali del complesso *C. pipiens* quali egli ha potuto attualmente definirli, almeno nell'area di distribuzione europea ed africana della zanzara comune, ad eccezione di *C. fatigans*. Tre entità maggiori, specie o sottospecie, possono essere distinte:

1) Il Culex rurale *pipiens pipiens*, anautogeno, eurigamo (talora steneurigamo),

eterodinamo e di solito ornitofilo, benchè capace di attaccare anche i pipistrelli nell'ambiente cavernicolo.

2) *pipiens berbericus*, sottospecie del precedente, anautogeno, steneurigamo, omodinamo e fortemente antropofilo.

3) *C. autogenicus*, autogeno, strettamente stenogamo, omodinamo e più o meno antropofilo. Si tratta in effetti di una specie differenziata morfologicamente e biologicamente, in cui sono riconoscibili popolazioni razziali secondarie, con o senza punteggiatura ventrale (*sternopunctatus* e *sternopallidus*), o diverse variazioni stabilizzate della colorazione ninfale, chetotassi, ecc.

Benchè tra questi diversi elementi della specie collettiva *C. pipiens* L., ed anche tra essi e *C. fatigans*, persistano le affinità sessuali, i loro incroci rivelano gli effetti di un'amissia più o meno intensa che porta nelle femmine fecondate da maschi di un altro tipo, ed anche di diverso ceppo alla produzione di deposizioni in parte o del tutto sterili. La sterilità è dovuta non a mancata fecondazione delle uova, ma bensì alla incapacità evolutiva che colpisce sia alcune uova nel corso dello sviluppo, sia soprattutto le larve primarie, nella loro totalità od in parte, prima della schiusa. Queste *larve letali* muoiono racchiuse nel corion. E' talvolta possibile, mediante azioni meccaniche o chimiche, di provocarne artificialmente la schiusa; si constata però che l'ulteriore evoluzione rimane il più spesso bloccata. Solo pochissimi individui danno luogo ad uno sviluppo lento e difficile. L'incapacità ad una effettiva riattivazione differenzia pertanto le larve letali di Culex dalle larve in diapausa nell'uovo, frequenti in diversi Culicidi (Aëdinei).

La produzione di uova a larve letali è stata osservata dall'A. in tutti i ceppi naturali studiati (una trentina), sia autogeni che anautogeni. Le esperienze hanno dimostrato che tale produzione è indipendente dalle azioni esterne, dall'alimentazione, dalle azioni di invecchiamento, ecc.. Essa rappresenta un fatto di incompatibilità fisiologica, di natura cromosomica o citoplasmatica, tra genotipi diversi del complesso *pipiens*. La presenza di larve letali nelle deposizioni di un determinato ceppo, naturale o artificiale, costituisce dunque la testimonianza di una anteriore interferenza del ceppo stesso con un altro rappresentante eterozigote della famiglia. La quasi-costanza del fenomeno permette di pensare che in natura non esistano verosimilmente più, ormai, ceppi genotipicamente puri di un qualunque tipo di *pipiens*, salvo forse in regioni geograficamente o localmente molto circoscritte.

Le ibridazioni possibili, nonostante le ricordate gravi influenze di letalità, tra i diversi rappresentanti della famiglia, possono introdurre alcune varianti secondarie nelle loro rispettive caratteristiche morfologiche o biologiche. Ma tali effetti modificatori sono fortemente frenati dalle rigorose influenze regolatrici inerenti alle interferenze sessuali. La dura legge di letalità che pesa sui possibili incroci, ne limita sostanzialmente la portata. Le larve letali che si osservano nelle deposizioni di diverse specie e sottospecie di *pipiens* debbono considerarsi l'espressione diretta del conflitto sessuale permanente che oppone l'uno all'altro i diversi genotipi. Da questo punto di vista, ogni elemento differenziale del complesso, per gli effetti letali che la sua interferenza sessuale è capace di ingenerare, rappresenta per gli altri un dannoso fattore di perturbazione biologica. L'amissia regolatrice, mentre frena le mescolanze genetiche tra le diverse popolazioni di Culex, interviene in definitiva, in natura, come un potente fattore di riduzione spontanea nell'ambito di questo curioso mosaico famigliare rappresentato dal complesso della comune zanzara.

SUMMARY

The author discusses the main constituants of the *C. pipiens* complex as he is currently able to define them — at least in the area of the European and African habitat of the common mosquito — with the exception of *C. fatigans*. Three main entities, species or sub-species, can be distinguisted:

1) The rural Culex *pipiens pipiens* — anautogenous, eurygamous (sometimes steneurygamous), heterodynamous and usually ornithophil, although also attacking bats in cavernous areas.

2) The *pipiens berbericus*, subspecies of the preceding — anautogenous, steneurygamous, homodynamous and *strongly anthropophil.*

3) The *C. autogenicus* — autogenous, strictly stenogamous, homodynamous and more or less anthropophil. Here it is actually a question of a species morphologically and biologically differentiated, in which can be distinguished secondary racial population with or without ventral punctuation (*sternopunctatus* and *sternopallidus*), or various stabilized variations of nymphal coloration, chetotaxia, etc.

Although sexual affinities persist between the various elements of the collective species *C. pipiens* L. and even with *C. fatigans*, cross-breedings reveal the existence of more or less severe amixia expressed in production of partially or even entirely sterile batches, in females fertilized by male of another type or even of another strain. The sterility is not due to failure of fertilization but rather to an evolutive incapacity affecting either certain eggs in the process of development or, principally, the primary larvae, in whole or in part, before hatching. These *lethal larvae* die inside the chorion. If it is sometimes possible to make them hatch artificially, by mechanical or chemical means, one notes that their later evolution most often remains blocked. Only very rare individuals manage a slow and difficult development. The inaptitude for effective reactivation, therefore, differentiates the lethal larvae of the Culex from those in diapause in the egg, frequent with various Culicides (*Aëdines*).

Production of eggs with lethal larvae has been observed by the author in all the natural strains, autogenous and anautogenous, that he has studied (about 30). The experiments showed that this production is independent of external condition, of feeding, of aging, etc. It represents physiologic incompatibility, of a chromosomic or cytoplasmic nature, between genotypes of the *pipiens* complex. The presence of lethal larvae in the batches of a given strain, natural or artificial, constitutes a test of previous interference of this strain with another heterozygous representative of the family. The near-constance of the phenomenon suggests that, in nature, probably a genotypically pure strain of any type whatever of *pipiens* does not exist at present except perhaps in regions very limited both in geographic occurrence and area.

The hybrid mixtures that, despite the noted marked lethal influences remain as possible between the various representatives of the family, can introduce certain secondary variants in their respective morphologic or biologic characteristics. But these modifying effects are strongly checked by the regulatory influences strictly related to sexual interferences. The hard law of lethality that controls the possible cross-breedings strictly limits their results. The lethal larvae observable in batches of different species or subspecies of the *pipiens* complex should be considered the direct expression of the permanent sexual conflict that opposes among themselves the different genotypes. Each of the differentiated elements of the complex represents, from this point of view, a factor of formidable biologic disturbance for the others because of the lethal effects that its sexual interference is susceptible of engendering. The regulatory amixia, while restraining the genetic mixtures between the different Culex populations, at the same time that it intervenes, definitively, in nature as a powerful spontaneous reducing factor in the midst of this curious familial mosaic which the common-mosquito complex represents.

BIBLIOGRAPHIE

CALLOT J. et DAO VAN TY (1943) : Sur quelques souches françaises de *Culex pipiens* L., *Bull. Soc. Path. exot.*, *36*, 229.

GASCHEN H. (1954) : La valeur du rapport T/P-5 pour l'identification du *Culex pipiens autogenicus*. *Mitheil. Schweizer. Entom. Gesellsch.*, *27*, (2) 173-175.

GHELELOVITCH S. (1952) : Sur le déterminisme génétique de la stérilité dans les croisements entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud, *C. R. Acad. Sc.*, *234*, 2386-2388.

GRASSI B. (1923) : Razze biologiche differenti di *Culex pipiens*. *R. Acad. Naz. Linc.*, *32*, 457-464.

GRASSI B. (1923) : Nuovi contributi alla biologia degli anofeli, ibid., *32*, 438.

MARSHALL G. F. et STANLEY G. (1937) : Some notes regarding the morphological and biological differentiation of *Culex pipiens* L. and *Culex molestus* Forskal (*Diptera Culicidae*). *Proc. R. Entom. Soc. London*, *12*, 17.

MATTINGLY P. F., ROZEBOOM, LLOYD EL, KNIGHT K. L., LAVEN H., DRUMMOND F. H., CHRISTOPHERS S. R. et SHUTE P. G. (1951) : The *Culex pipiens* complexe. *Trans. R. Entom. Soc. London*, *102*, 331-382.

ROUBAUD E. (1933) : Essai Synthétique sur la vie du moustique commun (*Culex pipiens*). *Ann. Sc. nat. Zoologie*, 10e série, *16*, 5.

ROUBAUD E. (1941) : Phénomène d'amixie dans les intercroisements de Culicides du groupe *pipiens*. *C. R. Acad. Sc.*, *212*, 257-259.

ROUBAUD E. (1945) : Le Problème de l'espèce chez le Moustique commun *Culex pipiens* L.,*Bull. Soc. Path. exot.*, *38*, (1-2), 47-60.

ROUBAUD E. (1945) : L'hybridation, facteur régulateur naturel des populations culicidiennes chez le Moustique commun. *C. R. Acad. Sc.*, *220*, 229-231.

ROUBAUD E. (1945) : Résistance au jeûne hibernal chez le Moustique commun *Culex pipiens* L., *Bull. soc. Path. exot.*, *38*, 105-111.

ROUBAUD E. (1948) : Oeufs *dormants* chez un biotype européen de l'*Anophèles claviger* Meig. (*bifurcatus* L.). *C. R. Acad. Sc.*, *226*, 1867-1869.

ROUBAUD E. (1948) : Variations raciales et variations individuelles du comportement spatial d'accouplement chez l'*Anopheles claviger* (*bifurcatus*) - ibid. *226*, 2036-2039.

ROUBAUD E. et GHELELOVITCH S. (1950) : Observations sur plusieurs souches naturelles hybridées de Culex autogéne (*C. autogenicus* Roub.). *C. R. Acad. Sc.*, *230*, 341-343.

ROUBAUD E. et MEZGER J. (1934) : Sur la sensibilité au Paludisme des Oiseaux (*Plasmodium relictum*) des divers peuplements raciaux du Moustique commun *Culex pipiens*. *C. R. Acad. Sc.*, *192*, 170-172.

ULMANN E. (1941) : Die regulatorische Bedeutung der Bevölkerungsdichte für das naturliche Gleichgewicht einer Arh. *Zeitschr. Ang. Entom.*, *28*, 1-180.

VERMEIL C. (1952) : Contribution à l'étude d'un biotype tunisien du Moustique commun *Culex pipiens* L., *Bull. Sc. Path. exot.*, *45*, 546.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

NOSTRE RICERCHE SULLE ELMINTIASI UMANE ED ANIMALI IN PUGLIA

(RIVISTA SINTETICA)

G. SANGIORGI (*) e E. RUCCI (*)

Già sin dai primordi dell'attività in Puglia del nostro Istituto si profilò nel pensiero di uno di noi (S) l'opportunità di rivolgerla, come, si può dire, « nuova » verso l'incidenza quantitativa a qualitativa degli elminti sia nell'uomo che negli animali. Elminti da repertare coll'esame sistematico o accidentale delle feci nonchè di qualche sustrato inanimato sospetto di esserne inquinato.

Cominciò LIDDO (I) con una indagine sistematica portata su 500 soggetti negli anni 1932 e 1933. Dalla quale risultò che 87 (17,4%) erano inficiati da elminti e precisamente 59 (11,8%) con infestazioni uniche, 22 (4,4%) con infestazioni doppie, 6 (1,2%) con infestazioni triple. Prevalente l'infestazione da *Trichuris trichiura.*

Nel computo assoluto le donne risultarono più infestate degli uomini. Con *T. trichiura* furono repertati inoltre, *Ascaris lumbricoides, Taenia saginata, Strongyloides stercoralis, Enterobius vermicularis.* Allo stesso A. (2) occorse di osservare in un soggetto adulto affetto da disordini intestinali una forma di *Hymenolepis diminuta* accompagnata, a parte la coesistenza del tricocefalo, da tutto un quadro microparassitologico comprendente forme di *Lamblia,* di *Bodo,* di *Entamoeba coli* e di *Blastocystis hominis.* Reperto interessante, come piuttosto raro, a giudicare, almeno, dal numero dei casi che sino al 1938 erano stati segnalati in Italia. Appena 12. Il 13° toccò di osservarlo a FROSINI (3) e in un contadino di Lucania a segno della fino allora insospettata presenza di questo cestode in quella regione. Ma più frequente si è dimostrata la vicina specie *Hymenolepis nana.* E contro il pregiudizio che la H. nana fosse appannaggio dei bambini BEVERE (4) l'ha vista in adulti sottolineando che il nostro Istituto in undici anni ne aveva osservati ben 9 casi, di cui 3 occorsi nel solo 1942.

(*) *Istituto di Igiene della Università di Bari* (Direttore: Prof. G. SANGIORGI).

Ma in fatto di elmintiasi la nostra caccia in Puglia fu coronata da un successo inatteso: dal ritrovamento dell'anchilostomiasi in un soggetto di Scorrano, nel Salento. Fortunato osservatore ne è stato ATTIMONELLI (5). Ma la constatazione di oasi argillose sul lastrone calcareo che costituisce il sottosuolo di Puglia lasciò pensare che il reperto non dovesse rimanere « unico » ma che altri tosto sarebbero venuti alla luce data la predisposizione che alla vita dei parassiti offriva così il suolo. Un'inchiesta ulteriore dello stesso A. (6) ne rilevava infatti altri 10 casi, mentre fissava l'identità della parassitosi che risultò essere sostenuta da *Necator americanus*. Secondo ATTIMONELLI l'infestazione salentina da *Necator* non poteva sorprendere quando si consideri ch'essa potrebbe aver avuto origine lontana, in un'epoca (dal 1880 al 1910) in cui vi è stata una vivace corrente da e per l'America del Sud (Brasile).

Altri casi di anchilostomiasi venivano in seguito segnalati da LIDDO (7) in prov. di Bari e in prov. di Taranto, nonchè da osservatori estranei al nostro Istituto come da SACCOMANNO e LAPORTA a Lecce, (8), da MONGELLI (9) in quel di Gallipoli. Il tutto a ribadimento del concetto che l'uncinariosi è da ritenersi infestione endemica in Puglia e più particolarmente nel Salentino.

Un'altra curiosità ci portava ad indagare, fra i bambini di Bari fra 0 e 12 anni a quale epoca della vita cominciasse ad insediarsi un parassitismo intestinale. A tal proposito LOCONTE (10) potè mettere in rilievo che elminti (*H. nana*, *A. lumbricoides*) si affacciano già nel 1° anno di vita e che essi diventano più frequenti man mano che progrediscono gli anni raggiungendo un'acme d'incidenza dal 3° al 7° anno. Acme che segna in questo settore, ai margini della 2ª infanzia ben il 50% di infestati e col concorso, oltre che dell'ascaride prevalente, di tricocefali e di ossiuri.

Uova di Ascaridi ha riscontrato SFORZA (11) nelle verdure (cicoria) di Noicattaro sia prelevate dal terreno che dal mercato.

La coincidenza di ascaridiosi in soggetti affetti da amebiasi ha indotto poi ATTIMONELLI (12) a cercare nei vermi il protozoo. In realtà si son riscontrate di esso forme precistiche e cistiche nel corpo dei vermi; forme che eliminate dai vermi tenevano viva l'infezione amebica nell'intestino dei soggetti infestati. In un montone, occorso nel macello di Altamura, CIANCIOTTA (13) ha osservato una strongilosi polmonare da *Strongylus capillaris* e una distomatosi epatica da *Dicrocoelium dendriticum* e ancora nel fegato una colpidiosi da *Colpidium striatum*. Tutti e tre i reperti nello stesso animale.

Nei ratti di Bari LIDDO e M. SANGIORGI (14) han repertato *H. diminuta H. nana fraterna*, *Strongyloides ratti*, *Tricocephalus nodosus* (*Capillaria* sp. *intestinalis*). Questi 3 ultimi nello stesso soggetto e come reperto « trino ».

Uno strongiloide di difficile identificazione ha osservato LIDDO (15) nei pipistrelli (*Rhinolophus ferrum equinum*) catturati nelle grotte di Castellana. E coll'ignoto strongiloide uova di *Capillaria rara* Ricci.

Ancora a LIDDO (16) il reperto di forme teratologiche di uova di *A. lum-*

bricoides mostranti delle protuberanze laterali deformatrici del loro consueto inconfondibile aspetto. Protuberanze alle quali concorre l'intero involucro esterno e se occorre che siano molto pronunziate non è difficile osservare come il materiale della massa interna vi faccia ernia. Altra curiosità ha recentemente messo in rilievo uno di noi (R.) (17) constatando la perfetta conservazione ultratrentennale della morfologia di uova di botriocefalo in feci aggiunte di glicerina.

Finalmente Bevere (18) in uno studio riguardante l'influenza della depurazione artificiale dei liquami luridi sugli elminti ha potuto concludere affermando che questa pratica igienica non è in grado di eliminare dai liquami nè le uova di ascaride nè le forme larvali di *Anguillula intestinalis*. Permane pertanto il pericolo dell'infestazione cogli affluenti sia dei percolatori che dei fanghi attivati. Questa, in conclusione, la sintesi di tutto un ciclo di nostre ricerche dedicate alla macroparassitologia pugliese che culminate coll'evidenziamento dell'anchilostomiasi ci ha permesso di constatare dei fatti non del tutto privi di interesse sopratutto dal punto di vista epidemiologico.

RIASSUNTO

Gli AA. in una rapida sintesi danno conto dei reperti di elminti osservati in Puglia sia nell'uomo che negli animali. Dal punto di vista igienico-sociale particolarmente importante quello dell'anchilostomiasi nel Salento da *Necator*.

SUMMARY

A synthetic account of worms observed in Apulia on man and animals. A particular relief is given to the presence in the Salento of Ancylostomiasis by *Necator*.

BIBLIOGRAFIA

1 - Liddo S. (1934): *Accademia Pugliese di Scienze, IX.*
2 - Liddo S. (1938): *Pathologica*, 436-37.
3 - Frosini D. (1940): *Pathologica*, 300-1.
4 - Bevere L. (1943): *Annali d'Igiene*, 18-19.
5 - Attimonelli R. (1942): *Pathologica*, 370.
6 - Attimonelli R. (1947): *Annali Igiene*, 272-73.
7 - Liddo S. (1949): *Acta Medica italica di malattie inf. a paras.*, 9-11.
8 - Saccomanno e Laporta (1946): *Boll. Soc. Medic. e Chirurg. del Salento.*
9 - Mongelli (1952): *Riforma medica*
10 - Laconte N. (1952): *Igiene e Sanità Pubblica*, 29-31.
11 - Sforza F. (1949): *Igiene San. Pubbl.*, 331-333.
12 - Attimonelli R. (1951): *Atti Acc. Pugliese di Scienze.*
13 - Cianciotta A. (1934): *Pathologica*, 213-214.
14 - Liddo S. e Sangiorgi M. (1941): *Rivista di Parassitologia*, 241-245.
15 - Liddo S. (1951): *Igiene San. Pubbl.*, 507-510.
16 - Liddo S. (1939): *Pathologica*, 252.
17 - Rucci E. (1954): *Giornale Batteriologia Immunologia, XLVII*, 47.
18 - Bevere L. (1943): *Annali Igiene*, 382-383.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

STUDIES ON *PARACOOPERIA NODULOSA* (SCHWARTZ, 1928) FROM PAKISTAN

M. M. SARWAR (*)

Schwartz (1928) originally described *Cooperia nodulosa* from material sent to him from the Philippines from a carabao calf (*Bubalus bubalis*). The animal was reported to have died of inanition and was extremely emaciated at the time of death. The material comprised a portion of the small intestines which were riddled with small but conspicuously raised nodules varying from about three to five millimeters in diameter. Each nodule was provided with a small opening or a channel of communication between the parasite and the lumen of the intestine and contained a single worm.

Travassos, 1935 and Le Roux, 1936, respectively, proposed new genera viz: *Paracooperia* and *Schwartziella* for the species *Cooperia nodulosa* Schwartz, 1928 and *Cooperia serrata* Monning, 1931. By priority *Schwartziella* falls a synonym to *Paracooperia*.

Matoff (1938) studied *P. nodulosa* from buffaloes in Bulgaria. He found the nodules containing worms to be commonly present in buffaloes of ages between one and three years. He estimated the number of nodules as ranging commonly from 50 to 200, in different animals. In four of the heavily infested ones he found 273, 345, 353, and 987 nodules, respectively. He described the nodules as varying in size from a poppy seed to a hazel nut but the nodules of the size of a pea were common. During his investigations from September, 1933 to January, 1934, he found the worms commonly in the intestinal lumen and rarely in the nodules and postulated that development of the worms takes place in the wall of the intestine up to late autumn when they leave the nodules and enter the intestine, where the remaining development takes place. He did not, however, recover any young forms from the nodules.

(*) *Punjab College of Animal Husbandry, Lahore* from the *Department of Parasitology, London School of Hygiene & Tropical Medicine.*

Incidence

In a large scale investigation in Pakistan (Sheikhupura, Lahore-Punjab) the writer found that buffalo calves of ages between 6 months and 2½ years were infested with nodules, to the extent of several hundred in each animal. It was also observed that adult buffaloes never harbour either nodules or free worms. Twenty-three buffalo calves were thoroughly examined and in twenty-two animals both nodules as well as free worms occurred in the intestine. In the twenty-third animal, however, nodules only were found in large numbers. Because of the arduous nature of the task an accurate estimation of the worm burden could be carried out in only three calves, with the following results:

Buffalo calf	*Number of nodules*	*Number of free worms*
1.	524	—
2.	121	437
3.	101	453

As a rule the number of nodules ranged from a few to 500 and it was observed that older calves harboured a small number of nodules only. The

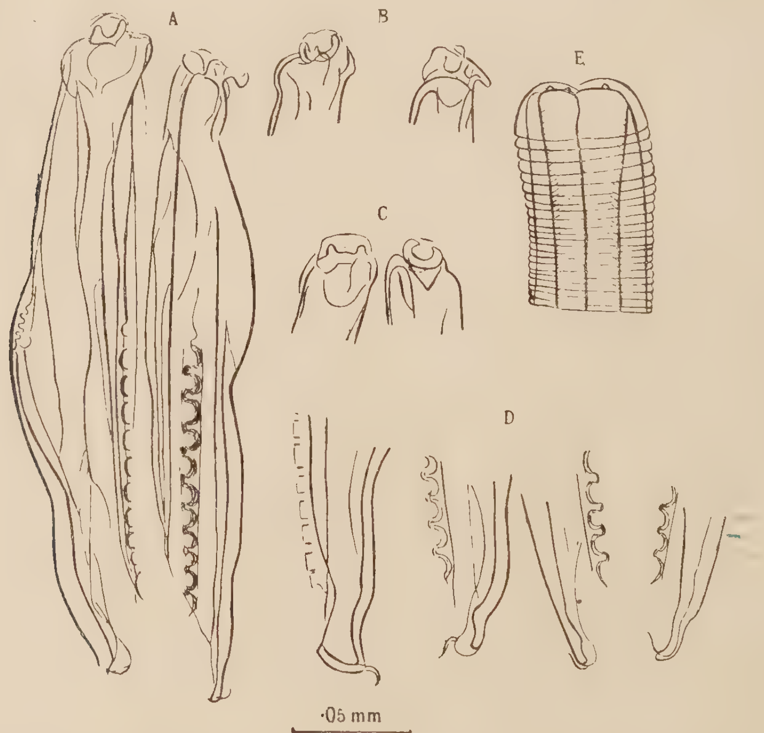


Fig. 1. - *Paracooperia nodulosa*, A. Spicules. B. and C. Anterior ends of lightly chitinized spicules. D. Posterior ends of spicules showing variations. E. Head end.

size of the nodules varied between that of a poppy seed and a pea. The nodules without openings could be more easily seen as bulging prominently through the peritoneal covering. The nodules with openings appeared on the mucous membrane as circular and arched, with the opening in the centre of a depression. The worms were found to lie between the muscular layers of the intestine. Each nodule contained only one worm. Larval forms in different stages of development were recovered from the smaller nodules. The sexually adult worms in the nodules did not show any morphological differences from those found in the intestinal lumen. The sequence of development of the parasite now seems to be cleared up as a result of this discovery of larval forms in different stages of development in the nodules.

A few worms of the same species were found in a collection from the intestine of a young sheep from Chiniot-Punjab. The collection was not examined on the spot and has been checked up only after arrival in London. The presence

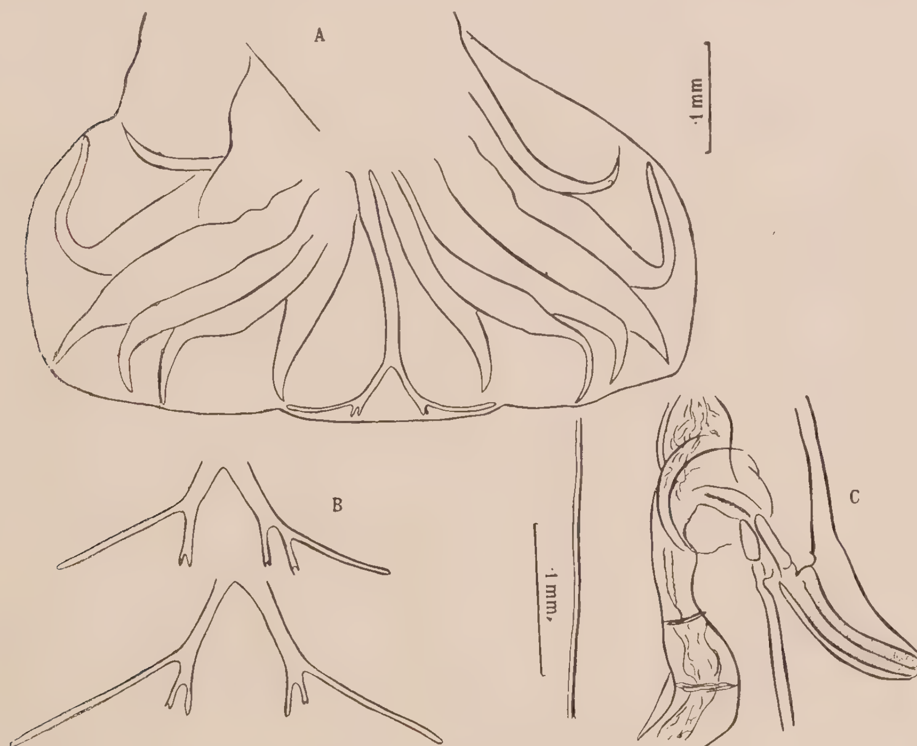


Fig. 2. - *Paracooperia nodulosa*, A. Bursa. B. Dorsal ray showing division. C. Vulvar region.

of *P. nodulosa* in a sheep caused a little surprise but as no buffalo calves were examined in the locality there was no possibility of an error. This young sheep happened to be the only animal that was examined for worms during the visit.

The other species found in the same sheep are, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis* and *Trichostrongylus probolurus*. None of these species are known to occur in buffaloes and are commonly found in this combination in sheep and goats in the Punjab. It is, however, possible that the occurrence of *P. nodulosa* in sheeps is analogous to *Cooperia* species i. e. *Cooperia punctata* and *Cooperia pectinata* which are known to infest young sheep but not the adults.

It has been observed in the Punjab that buffalo calves after weaning remain in a poor condition up to the age of two years. The phenomenon has been observed by the author in calves kept under his own observation. The local farmers attribute this condition to the change over from milk to coarse grass and the animal remaining in poor condition during its adjustment to the new feed. After two years the calves rapidly improve in condition although subsisting on more or less the same type of grazing. Since the first two years of life of the host coincide with the infestation of the animal with *P. nodulosa* it is possible that these worms play some part in contributing to the poverty of the animal during the period.

Morphology

The head end of the worm bears 4 submedian and 2 lateral papillae.

Male: The body measures 8-12 mm. in length and bears about 14 longitudinal lines. The width in front of bursa is 0.16-0.2 mm. and the width at the head end is 0.05-0.065 mm. The oesophagus measures 0.43-0.475 mm. long and 0.045-0.06 mm. at its maximum diameter. The cervical papillae and nerve ring are situated about 0.36 mm. and 0.23 mm. from the anterior end respectively.

The bursa is medium in size and is about 0.6 mm. broad, with fine spines in the middle portion and punctiform ridges at the periphery. The ventro-ventral ray is the smallest and thinnest and arises independently following a course at first backwards and then turning forward in its distal half. The latero-ventral ray is considerably thicker and is separated from the ventro-ventral. Its distal half narrows down considerably, turns forward on itself and approaches the tip of the ventro-ventral ray. The lateral rays run a parallel course backwards, the antero-lateral being thicker than the other two. The tips of all the lateral rays reach the bursal margin. The externo-dorsal rays are thick and arise symmetrically from the base of the dorsal ray. They do not reach the bursal margin. The dorsal ray is very thin and long and splits at about 0.05 mm. from the bursal margin. The length of the stem up to the division point is about 0.2 mm. The two principal branches subdivide into thick, short medial branches and thin, long lateral branches. The medial branches are cleft at their distal ends. The form of division of the dorsal ray, however, seems to show considerable variation (Fig. 2B).

The spicules are equal or subequal according to the degree of chitinization. If lightly chitinized, they are more or less equal in length and can be easily rolled from side to side. If heavily chitinized, on the other hand, they are always subequal in length, the ventro-lateral limb in one of the spicules being distinctly bent inwards. Such spicules are, however, difficult to roll. Both type of spicules are compact and sturdy and dark brown in colour, the shade in the heavily chitinized spicules being deeper. The spicules are thich in the middle and distally acuminate. They divide into two limbs in their posterior two-thirds, the ventro-lateral and dorso-medial limbs. The ventro-lateral limb is slightly longer than the dorso-medial and is furnished with a hooklet at its distal end. The distal end of the ventro-lateral limb or the foot of the spicule shows considerable variation in form (Fig. 1D), depending, however, on the degree of

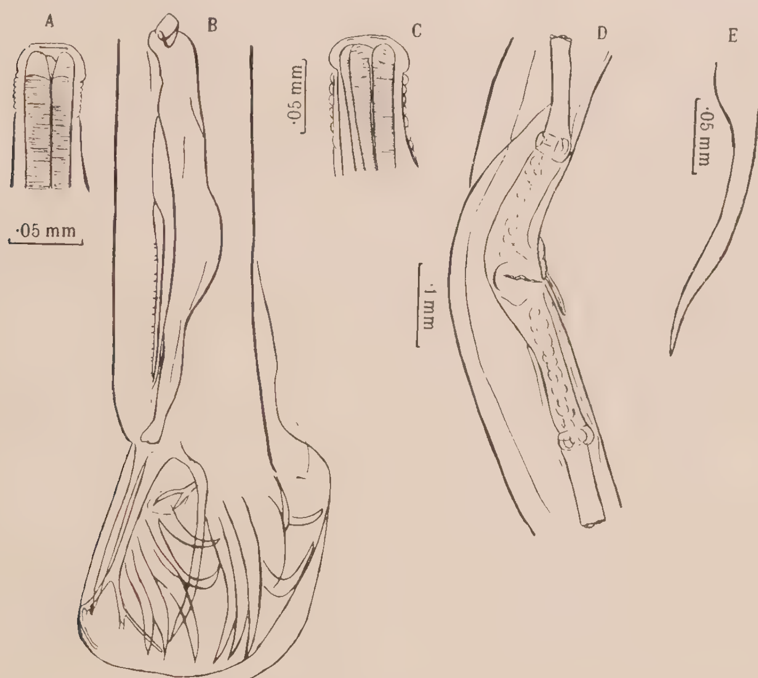


Fig. 3. - *Paracooperia nodulosa*, Very young male and female. A. Head end of male. B. Spicule and bursa. C. Head end of female. D. Vulvar region. E. Tail of femal.

chitinization and pigmentation of the spicules. The dorso-medial limb is shorter, thinner and shows a wavy ridge on its medial side. The ridges in both the spicules show an almost equal number of semi-lunar cusps and which were found to vary, in a large number of specimens examined, from 9 to 12, in each spicule. The lengths of spicules (in mm.) and the number of semi-lunar

cusps in each were, in fourteen specimens, found to be as follows, the number being indicated in parenthesis:

0.29, 0.295 (11, 11); 0.29, 0.295 (11, 12); 0.27, 0.275 (10, 10); 0.27, 0.272 (10, 10); 0.29, 0.29 (11, 11); 0.274, 0.278 (11, 11); 0.28, 0.28 (9, 10); 0.29, 0.29 (9, 10); 0.28, 0.287 (9, 9); 0.28, 0.28 (11, 11); 0.265, 0.27 (11, 12); 0.272, 0.278 (11, 12); 0.285, 0.285 (10, 10); 0.265, 0.275 (9, 10).

Female: Body measures 10.5-12.5 mm. long and has a width of 0.06-0.075 mm. at the head end and 0.18-0.21 just before the vulva. Oesophagus measures 0.45-0.53 mm. long and has a maximum diameter of 0.05-0.065 mm. Vulva is situated 2.2-2.35 mm. from the posterior end and is covered with a backwardly directed lingual shaped flap. In a few hundred female specimens examined the vulvar flap was more or less constant in shape and size. The flap consists of cuticular layers and subcuticular pulp and measures about 0.13 mm. long and 0.03-0.35 mm. thick, the thicknes of the inner core being about 0.02 mm. The combined ovejectors measure 0.42-0.47 mm. in length. The body tapers to a fine point behind the anus which is situated at a distance of 0.2-0.22 mm. from the tail end. There are two fine lateral papillae between the anus and tail end, at about 0.085 mm. from the latter. The eggs measure 0.06-0.065 × 0.03-0.04 mm. as against 0.040-0.051 × 0.031 and 0.04-0.05 × 0.038 mm. in Schwartz's, 1928 and Matoff's, 1939 specimens, respectively.

Fourth stage larva. — A number of fourth stage larvae in an advanced stage of development were recovered from small nodules. The males meas-

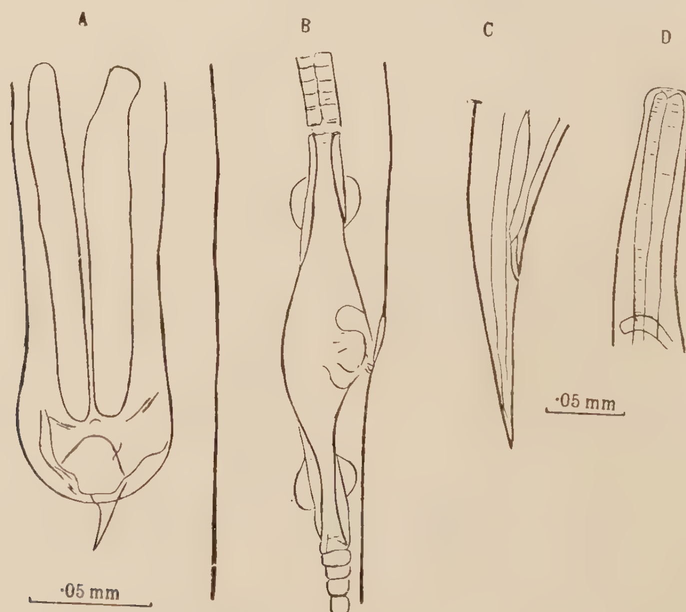


Fig. 4. - *Paracooperia nodulosa*, fourth stage larva. A. Posterior end of male. B. Vulvar region. C. Tail of female. D. Head end.

ure 3.6-3.85 mm. long with a maximum width of 0.11 mm. at the bursal region. The cuticle shows fine striations but no papillae were observed. The oesophagus is club-shaped and measures 0.265-0.35 mm. long and 0.04 mm. at its maximum width. The width at the head end is about 0.03 mm. The nerve ring lies 0.17 mm. from the anterior end. The spicules are as yet incompletely formed and the genital tube is recognizable. The worms show some bursal formation but rays are not yet distinguishable.

In the very young adult male the bursal rays are clearly seen although they are small. The spicules are approaching the adult form and measure 0.27-0.28 mm.. their development being considerably in advance of the other genital organs. The worms measure 5.2-5.25 mm. long with a width of 0.095 mm. in the region of the spicules. The width at the head end is 0.045 mm. The nerve ring and exretory pore lies 0.22-0.25 mm. and 0.28 mm., respectively, from the anterior end.

In the female fourth stage larva, ovejectors are considerably developed, the uteri are small and show traces of their lumina, and young ovarian tubules are in process of growth from their distal ends. The larva measures about 3.8 mm. long and has a maximum width of about 0.07 mm. The head end measures about 0.03 mm. wide and the nerve ring lies about 0.16 mm. from the anterior end. The tail measures about 0.07 mm. long and the vulva lies at about 0.7 mm. from the tail end.

In the young female the ovejectors are approaching the adult and a small vulvar flap is clearly noticeable. The worms measure about 6.3 mm. long and 0.135 mm. wide near the vulva. The oesophagus measures 0.45 mm. long with the nerve ring 0.2 mm. from the anterior end. The tail is 0.2 mm. long and the vulva is situated about 1.35 mm. from the tail end.

Discussion

The material from Pakistan described in this paper conforms in all essential details with that of Schwartz, 1928 and Matoff, 1938. There are some slight differences in the size of the spicules in the three lots of material, from Bulgaria, the Philippines and Pakistan respectively, but the conformation of the spicules is the same in all. The spicules in Schwartz's material measure 0.304-0.32 mm. while in that of Matoff they measure 0.296 mm. (right spicule) and 300-304 mm. (left spicule), respectively. The semi-lunar cusps on the medial side of the dorso-medial limb of the spicules number 9-12 in Matoff's as well as the author's specimens, while 9 cusps are shown in each spicule by Schwartz, (1928) and Travassos, (1937) in drawings of Philippine material. The material from the three regions appears, however, to be identical beyond any doubt.

SUMMARY

1. - *Paracooperia nodulosa* is recorded as an extremely common parasite of young buffaloes in Indo-Pakistan.

2. - The species is recorded for the first time from a sheep (*Ovis aries*).

3. - Larval forms in different stages of development have, for the first time, been recovered from nodules and are described in the paper.

4. - The material agrees in every respect with the descriptions of MATOFF (1938) and SCHWARTZ (1928).

RIASSUNTO

1. - *P. nodulosa* viene segnalato come un parassita estremamente comune nei giovani bufali dell'Indo-Pakistan.

2. - La specie viene segnalata per la prima volta nella pecora (*O. aries*).

3. - Forme larvali, in vari stadi di sviluppo, sono state rinvenute per la prima volta in noduli, e vengono descritte nel lavoro.

4. - Il materiale corrisponde in tutto alle descrizioni di MATOFF (1938) e di SCHWARTZ (1928).

BIBLIOGRAPHY

LE ROUX, P. L. (1936): On *Schwartziella*, a new nematode genus for *Cooperia nodulosa* Schwartz, 1928. *J. Helminth.*, *XIV*, *2*, 113-118.

MATOFF, K. (1938): Über das verkommen von *Schwartziella nodulosa*. (Schwartz, 1928) in bulgarischen buffeln. *Z. Parasitenk.*, *10*, 3, 329-339.

SCHWARTZ, B. (1928): A new species of Trichostrongylid worm of the genus *Cooperia* from the Carabao in the Philippine Island with a review of the genus. *Proc. U. S. Nat. Mus.*, *74*, Art. 20, 1-5.

TRAVASSOS, L. (1937): Revisão da familia Trichostrongylidae Leiper, 1912. *Monogr. Inst. Oswaldo Cruz*, N. 1, 512 pp.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

LA PREMUNITION ANTIPALUDIQUE ET LES ACCES DE PREMUNIS

EDMOND SERGENT (*)

Un organisme qui a résisté à une première attaque d'un germe infectieux acquiert de ce fait un accroissement de son pouvoir de défense contre un assaut ultérieur d'un germe de même espèce. Cette résistance acquise peut être de deux sortes, suivant la nature du microbe agresseur et aussi suivant l'espèce animale attaquée. Dans certaines maladies infectieuses (rougeole, fièvre typhoïde, etc.), la guérison clinique de l'accès aigu de première invasion s'accompagne de la guérison parasitaire: les microbes sont exterminés. Cette victoire complète de l'organisme déparasité lui confère l'immunité vraie, stérilisante, très solide et durable; il ne se produit pas de rechutes, ni de récidives. Dans d'autres maladies infectieuses (paludismes, tuberculose, syphilis, brucelloses, etc.), la guérison clinique ne s'accompagne pas de la guérison parasitaire, la victoire de l'organisme n'est pas complète, les microbes ne sont pas complètement exterminés: ils continuent à végéter sans bruit à l'état latent. Organisme et microbes se tolèrent réciproquement. C'est la paix armée. Si, plus tard, la défense organique faiblit par suite d'une maladie intercurrente, des intempéries, d'une alimentation insuffisante, d'une fatigue excessive, les microbes, qui ne sont plus tenus en échec, pullulent, et c'est la rechute.

De plus, la présence d'une infection latente, tant qu'elle est bien supportée. protège l'organisme contre l'invasion d'un autre microbe de même espèce (parfois même du même genre, chez les anaplasmes par exemple). C'est la « loi du premier occupant ». Tant que dure l'infection latente, il ne peut y avoir de surinfection; la présence d'un microbe latent tient en alerte la défense organique. Mais dès que survient la guérison parasitaire, l'organisme, redevenu neuf, peut être réinfecté. L'accès consécutif à la réinoculation peut être aussi ou plus violent que l'accès de première invasion.

Cette conception de la prémunition, résistance liée à la présence d'une in-

---

(*) *Institut Pasteur d'Algérie, Alger.*

fection latente, est à la base de l'invention d'un vaccin des plus remarquables: le BCG, dont l'innocuité et l'efficacité sont bien établies. La vaccination contre l'avortement épizootique des vaches, brucellose, est de même une vaccination prémunitive. On peut présumer que contre la syphilis c'est aussi un vaccin prémunitif qu'il faudrait découvrir.

L'étude expérimentale de la prémunition est particulièrement aisée dans les maladies dues à des hématozoaires, telles que les paludismes, les piroplasmoses, parce que, en plus de l'observation de l'accès clinique, on peut suivre au microscope le déroulement de l'accès parasitaire et en mesurer l'intensité, — on peut inoculer des témoins constitués par des animaux neufs de même espèce, — on peut, par l'« épreuve d'infection » et l'« isodiagnostic », déceler des infections latentes, « métacritiques » ou « d'emblée ».

Les inoculations expérimentales permettent d'apporter des précisions sur les effets de la réinoculation d'une plasmodie à un sujet prémuni contre cette même plasmodie. L'examen du sang du sujet réinoculé ne décèle parfois aucun parasite, ou bien n'en montre qu'un petit nombre pendant quelques jours. Pour apprécier l'intensité de cet accès du réinoculé, de cet accès de prémuni, il faut observer de même façon des animaux neufs témoins, inoculés en même temps, avec la même dose et suivant la même technique. Dans l'immense majorité des cas, les accès des témoins sont bien plus violents, la parasitémie plus élevée et plus durable. Avec certaines plasmodies très virulentes, on peut instituer des expériences où les témoins meurent, tandis qu'après un accès faible les prémunis survivent. Les plasmodies qui apparaissent à ce moment dans le sang périphérique des sujets prémunis réinoculés sont d'ailleurs peut-être issues des germes latents que leur organisme héberge déjà. Ces données expérimentales concordent tout à fait avec les observations cliniques de la pratique. Chez un sujet prémuni contre le paludisme, une nouvelle contamination ne donne jamais d'accès pernicieux. C'est ce qui explique la résistance relative opposée aux réinfections par les Indigènes et les vieux colons d'une région paludéenne, qui gardent une infection latente depuis leur enfance.

Telle doit être la conception d'un « accès de prémuni » (1). Il ne faut pas se laisser induire en erreur par la comparaison avec le résultat de la réinoculation d'un sujet vacciné contre une maladie infectieuse conférant l'immunité vraie. Dans ce dernier cas, la résistance est, en règle, absolue. Et encore n'a-t-on pas vu de jeunes soldats correctement vaccinés contre la typhoïde et les paratyphoïdes, contracter, quelques mois plus tard, une typhoïde grave? Toute résistance peut être forcée, qu'elle soit immunisante, prémunissante, ou même innée, comme le montre la fameuse expérience de PASTEUR sur les poules inoculées de charbon bactéridien et refroidies.

L'immunité vraie n'est pas toujours absolue. La prémunition est toujours

(1) *Cf.* Les « accès de prémunis ». *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 15, 2, juin 1937, 139-141.

« relative », suivant l'expression de WASIELEWSKY. On est bien obligé de s'en contenter contre tout un lot de maladies infectieuses, dues à des bactéries, des protozoaires, des champignons, des ultravirus, qui ne confèrent pas l'immunité vraie — et elle peut suffire à protéger l'individu : témoin la vaccination antituberculeuse par le BCG.

Au surplus, ce doit être par le même processus de défense que l'organisme acquiert soit l'immunité, soit la prémunition, suivant la nature des organismes-hôtes et la nature des microbes assaillants, suivant que les premiers sont plus ou moins résistants et les seconds plus ou moins vulnérables. La surabondance des anticorps spécifiques élaborés par certains organismes contre certains germes procure l'immunité vraie, qui est une « guérison qui continue » et qui, par suite, est sourtout humorale, tandis que la prémunition, comme la résistance innée, relève surtout de la phagocytose.

En résumé, les inoculations expérimentales permettent de définir d'une façon précise les réactions des sujets prémunis que l'on réinocule. La prémunition n'est pas une *therapia sterilisans magna*. Parfois ces réactions annihilent les effets de la réinoculation : pas d'accès aigu. Il arrive que l'accès se produit, mais alors il est très atténué, comme avorté et parfaitement supportable, tandis que les témoins neufs inoculés avec la même dose virulente ont un accès grave.

RESUME

Lorsqu'un sujet, survivant à une maladie infectieuse, conserve une infection latente après sa guérison clinique, cette « prémunition » le protège contre une nouvelle attaque de la même maladie infectieuse. La résistance ainsi acquise est parfois complète : la réinoculation ne provoque pas d'accès aigu de surinfection ; parfois aussi elle n'est que relative : un accès se produit, mais cet « accès de prémuni » est bénin, comme avorté.

RIASSUNTO

Quando un soggetto, che sopravviva ad una malattia infettiva, conserva una infezione latente dopo la sua guarigione clinica, tale « premunizione » lo protegge da un nuovo attacco della stessa malattia infettiva. La resistenza in tal modo acquisita è talvolta completa : la reinoculazione non provoca alcun accesso acuto di « superinfezione » ; talvolta, invece è solo relativa : si produce un accesso, ma tale « accesso di premunito » è benigno.

SUMMARY

When a patient outliving an infections disease, retains, after his clinical recovery, a latent infection, it gives him a « premunition », a protection against a new attack

of the same disease. The so obtained resistance may sometimes be total, and, if proceeded to a new inoculation, an acute outburst, a « superinfection », is not to be feared. In some cases, however, the safety is only partial, but if a fit happens, it will be milder, as it were checked up.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

CE QU'IL ADVIENT AVEC DES HELMINTHES DU *CITELLUS CITELLUS* AU COURS DU SOMMEIL HIBERNAL DE CE RONGEUR

TSCH. SIMITCH et ZL. PETROVITCH (*)

Quoique les endoparasites de plusieurs espèces de *Citellus* soient suffisement étudié, nous devons toutefois reconnaitre dès à présent que nous savons encore peu de ce qu'il advient avec eux au cours du sommeil hibernal de ces rongeurs, dont la température durant cette période s'abaisse presque au niveau de celle du milieu ambiant.

Les publications traitant cette question sont peu nombreuses et à notre connaissance il n'y en a que quatre; une de Brumpt, une de Sassuchin et deux de nous. Brumpt en étudiant *L. donovani* chez *C. citellus* expérimentalement infecté par ce parasite, a démontré qu'il survit pendant l'hibernation de ce rongeur. Sassuchin, n'ayant pas trouvé aucun des protozoaires intestinaux dans le contenu coecal de deux *C. pigmeus,* sacrifié à la période de leur réveil après l'hibernation, a conclu que ces parasites périssent au cours du sommeil hibernal de ces rongeurs. Dans nos deux notes préliminaires: l'une de 1951 et l'autre de 1952, nous avons démontré que les protozoaires intestinaux de *C. citellus* de Vojvodina ne disparaissent pas au cours du sommeil hibernal de ce rongeur sans égard au degré de l'abaissement de sa température et la durée de celle ci. Les résultats de 1951 et 1952, obtenus en éxaminant les *C. citellus* gardés au laboratoire, ont été confirmés par ces recherches, faites sur les animaux capturés dans la nature tout de suite après leur réveil. Chez de tels *C. citellus* nous avons trouvé les même espèces de protozoaires que nous avions trouvé chez les animaux examinés au cours de l'été précedant. D'un autre côte, chez les *C. citellus* en hibernation à part des protozoaires intestinaux un de nos collaborateurs vient de trouver dans leur sang un trypanosome, qui n'est pas encore déterminé.

De nos recherches de 1951, 1952 et celles de 1953, il ressort clairement que les protozoaires intestinaux ainsi que le trypanosome du sang ne dispa-

(*) *Institut de Parasitologie de l'Académie Serbe des Sciences. Belgrade.*

raissent pas au cours du sommeil de ce rongeur sans égard au degré et la durée de la température abaissée. Par conséquent, les protozoaires du *C. citellus* de Vojvodina se maintiennent d'une année à l'autre dans le corps de l'animal et non en dehors de lui. Toutefois, avec l'abaissement de la température du *C. citellus* au cours du sommeil hibernal, la populations de certaines espèces de protozoaires intestinaux diminue considérablement, mais elles ne disparaissent pas, même dans les cas quand la température de ces rongeurs reste entre 6 et 14°C pendant un mois. Mais il suffit d'un reveil de 2 à 3 jours pour que la population de telles espèces de protozoaires renviennent à ses limites normales.

Cependant, de ce qu'il advient avec des helminthes de *Citellus* au cours du sommeil hibernal de ce rongeur, il n'y a pas à notre connaissance aucune publication. En rapport avec cela, il se pose la question, existe-t-il à ce point de vue quelques différences entre les protozoaires et les helminthes, c'est à dire ces derniers sont-ils aussi résistants envers l'abaissement de la température de son hôte.

En étudiant la faune des protozoaires intestinaux du *C. citellus* de Vojvodina, sacrifiés au cours de leur sommeil hibernal, nous avions remarqué dès le debut de ces recherches que les helminthes contrairement aux protozoaires ont été trouvés rarement. A cette période de la vie du *C. citellus,* nous ne trouvions pas même des espèces des helminthes que nous rencontrions très frequemment au cours de la période en dehors de l'hibernation de ce rongeur. Cette constatation nous a incité à entreprendre séparément l'étude de la longévité de helminthes de ce rongeur au cours de son sommeil hibernal.

Cependant, avant de communiquer les résultats de nos recherches se rapportant à l'étude de la question de ce qu'il advient avec les helminthes du *C. citellus* de Vojvodina durant son hibernation, nous nous arreterons brièvement sur la vie de ce rongeur ainsi que sur les helminthes trouvés chez lui au cours de différents mois de l'année.

Dans Vojvodina — la région de Yougoslavie situé au nord du Danube — *C. citellus* est très repandue, surtout dans le Srem et le Banat du Sud. Dans cette partie de Yougoslavie la vie active de *C. citellus* dure approximativement 7 mois et demi, c'est à dire du 15 mars à la fin du mois d'octobre. Entre le 15 avril et le 1 mai, les femelles ayant passé l'hiver dans les trous du sol, mettent au mond 5 à 8 nouveaux-nés et c'est la seule géneration des jeunes pendant toute cette période. A partir de la deuxième moitié du mois d'octobre les animaux peu à peu commencent à se retirer dans leurs trous hibernaux et déjà dès le début du mois de novembre on ne les voit plus dans les champs. C'est le commencement de la période passive dans la vie du *C. citellus* de Vojvodina. Cette période dure approximativement 4 mois et demi, c'est à dire du 1 novembre au 15 mars de l'année suivante. Dans cette période de l'année *C. citellus* dort plus ou moins et c'est seulement pendant ce temps que sa température de 37°C s'abaisse à

celle du milieu ambiant. A la question, est-ce que *C. citellus* durant cette période dort continuellement ou se reveille périodiquement, il est impossible de répondre.D'un autre côté, nous ne savons non plus à quel degré s'abaisse la température des rongeurs endormis, car nous ne connaissons pas la température des trous dans lesquels ils se trouvent au cours de l'hiver.

Cependant, nous avons étudié cette question chez les *C. citellus* gardés au laboratoire pendant cette période de l'année. Des animaux, capturés à la fin du mois de septembre et au commencément du mois d'octobre 1952 et 1953, après l'examen de leur selles sur les oeufs des helminthes, ont été placés séparément dans les box spécialement construit pour eux. Bien entendu pour cette étude ont été choisis seulement des animaux avec une grande réserve de tissue adipeux.

A partir du mois de novembre, un aide enregistrait chaque jour la température minima et maxima de la pièce dans laquelle se trouvaient les box avec des *C. citellus* et puis il marquait, est-ce qu'il dormaient ou non. Les fenêtres de la pièce ont été ouvertes pendant tout l'hiver, excepté les jours quand la température extérieure descendait à plus de 3°C au dessons de 0°C. Pendant l'hiver la température de cette pièce variait suivant les mois entre 6 et 14°C. Par conséquent, la température des *C. citellus* dormants dans cette pièce oscillait entre 5 et 13°C.

Les *C. citellus* placés dans les box dont la partie obscure était remplie de paille, commençaient à s'endormir environ à partir du 10 novembre. Mais, il faut souligner des à présent que la durée du sommeil des *C. citellus*, gardés au laboratoire varie d'un exemplaire à l'autre, malgré qu'ils se trouvaient dans les mêmes conditions de logement. En effet, tandis que certains exemplaires ont dormi entre 6 novembre et le 1 mars jusqu'à 120 jours, les autres, à peine, ont dormi 10 à 20 jours pendant tout cette période. Parmi nos 80 *C. citellus* de 1952/53 et 120 de 1953/54, le nombre des jours du sommeil total a été de 120 jours au maximum, tandis que le nombre des jours du sommeil continu ne depassait pas 53. Mais, il faut souligner aussi, qu'il n'y a pas une parallèle entre le maximum du nombre des jours de sommeil total et le maximum du nombre des jours du sommeil continu. Ainsi par exemple, il y a d'un côté des *Citellus* avec 100 jours de sommeil total et moins de 15 jours de sommeil continu et de l'autre des *Citellus* avec seulement 60 jours du sommeil total mais plus de 30 jours de sommeil continu etc. Cependant, pour la longévité des helminthes chez *C. citellus* en hibernation les 20 jour du sommeil continu sont plus importants que 80 jours de sommeil total interrompu par des pauses de reveil chaque 10eme jour, car aussitôt que *Citellus* se réveille, sa température monte automatiquement à 37°C, c'est à dire à la normale. Alors avec la monté de la température les helminthes engourdis par l'abaissement de celle-ci reprennent sa vie normale. Par conséquent, pour qu'un espèce de helminthes de *C. citellus* soit tuée pendant l'abaissement de sa température, il faut qu'elle

agisse un temps déterminé, qui est comme nous le verrons plus tard, différent pour différentes espèces d'helminthes de ce rongeur.

Maintenant, nous nous arrêterons brièvement sur la faune des helminthes trouvés chez *C. citellus* de Vojvodina ainsi que sur sa répartition suivant les mois de l'année.

Dans ce but nous avons examiné jusqu'à présent 1525 exemplaires de *C. citellus,* capturés dans les différents endroits de cette région de Yougoslavie. De ces 1525 *Citellus,* 903 ont été examinés durant la période active de la vie de ce rongeur et les autres 622 au cours de son hibernation.

Par l'examen systématique de tous les organes des *C. citellus,* sacrifiés successivement entre le 20 mars et le 1 novembre, nous avons trouvé 12 espèces d'helminthes, dont 9 appartiennent aux formes adultes et 3 autres aux formes larvaires des cestodes.

De 9 espèces d'helminthes parasitant à l'état des parasites adultes chez *C. citellus* de Vojvodina, deux se rapportent aux Cestodes (*Hymenolepis nana* et *H. diminuta* var. *citelli*), 5 aux Nematodes (*Gongylonema longispiculum, Streptophagus kutassi, Trichostrongylus* sp., *Capillaria* sp., et *Oxyuroidea* sp.) et 2 aux Acantocephales. Quant aux 3 formes larvaires des Cestodes; la première se rapporte à *Cysticercus longicollis* (*T. crassiceps*), la deuxième à *Tetrathyridium variabile* et la troisième au cysticercus d'un cestode, dont nous ne connaissons pas encore la forme adulte.

La fréquence de 9 espèces d'helminthes, qui parasitent à l'état adulte chez *C. citellus* de Vojvodina et leur repartition suivant les mois au cours de la période active dans la vie de ce rongeur, sont très différentes. Nous en donnerons une courte communication, pour chaque espèce séparement.

Hymenolepis nana. — Ce *Hymenolepis* se trouve seulement chez *C. citellus* capturés au Srem et la aussi sa présence est peu fréquente. Ce parasite se rencontre à partir du mois du juin avec maximum de fréquence au mois d'octobre.

H. diminuta var. *citelli.* — Cette espèce, contrairement à *H. nana*, est très fréquente. Elle se rencontre durant les mois de la période active de ce rongeur avec la seule différence que sa fréquence est considerablement plus grande pendant les mois de juin, juillet, août, septembre et octobre en comparaison avec les mois de mars, avril et mai.

Gongylonema longispiculum. — Cette espèce de nematode, avec la localisation dans l'oesophage, est très fréquente chez *C. citellus* de toutes les parties de Vojvodina. Ce parasite se rencontre pendant tous les mois de l'année avec maximum de fréquence aux mois de juillet, août, septembre et octobre.

Streptophagus kutassi. — Ce nematode, avec la localisation dans l'estomac du *C. citellus*, est relativement peu fréquent, malgré qu'il se rencontre dans toutes les parties de Vojvodina. Il est présent chez *C. citellus* pendant tous les mois de la période active, sauf en mars et avril.

Trichostrongylus sp. — Ce nematode avec la localisation dans l'intestin grêle du *C. citellus* est très fréquent dans toutes les parties de Vojvodina, surtout dans le Banat du sud. Il se rencontre pendant tous les mois de la période active de ce rongeur, sauf au mois de mars et avril. Le maximum des animaux infestés est de juin à novembre.

Capillaria sp. — Cette espèce de nematode avec la localisation dan l'intestin grêle du *C. citellus* est très rare, étant donné qu'elle a été trouvée seulement chez 5 sur 903 animaux examinés. Elle a été trouvé pendant les mois de juin, juillet et septembre.

Oxyuroidea sp. — Chez un *C. citellus* sur 903 examinées, nous avons trouvé une femelle d'une oxyuroidea que nous n'avons pas pu déterminer.

Monilia moniliformis. — Cette espèce d'acantocephales avec la localisation dans l'intestin grêle est très fréquent chez *C. citellus* de toute la Vojvodina. Ce parasite se rencontre pendant tous les mois dans la période active de ce rongeur, avec seule différence qu'il est considérablement plus fréquent de juin à octobre que de mars à juin.

Macracanthorhynchus hirudinaceus. — Cette espèce d'acantocephales est relativement fréquente, mais n'arrive jamais jusqu'à sa maturité chez ce ronguer. Chez les animaux infestés on rencontre le plus fréquemment des parasites longs de 1 à 6 cm fixés avec leur trompe à la fois sur la partie interne et la partie externe de l'intestin grêle. Ce parasite se rencontre pendant tous les mois dans la période active du *C. citellus* sauf en mars et avril.

Pour voir qu'est ce qu'il advient avec les helminthes du *C. citellus* de Vojvodina au cours de la période de son hibernation, nous avons examiné systématiquement 622 exemplaires de ce rongeur. Cette étude se rapporte aux *C. citellus* (capturés vers la fin du mois de septembre et la première moitié du mois d'octobre) qui après l'examen des selles sur les oeufs des helminthes, ont été gardés pendant l'hiver dans les box, dont nous avions parlé antérieurement. Pour chaque animal sacrifié, nous connaissons donc avec quelles espèces d'helminthes il était infesté et ainsi combien de jours il a dormi avant d'être sacrifié.

En suivant la présence des helminthes chez *C. citellus* qui ont dormi plus de 10 jours sans interruption de sommeil avec ceux qui n'ont pas dormi ou ont dormi moins de 10 jours, nous avons pu apprécier l'influence de l'abaissement de la température sur la longévité de ces parasites. Mais pour mieux eclaircir cette question, nous prendrons en considération seulement les espèces des helminthes, que nous rencontrons fréquemment pendant la période active de *C. citellus* de Vojvodina. Ces espèces sont les suivantes: *H. nana*, *H. diminuta* var. *citelli*, *G. longispiculum*, *S. kutassi*, *Trichostrongylus* sp., *M. moniliformis* et *M. hirudinaceus.*

Les espèces des helminthes, mentionnées ci-dessus réagissent différemment

à l'abaissement de la température de leur hôte, c'est à dire *C. citellus*. En rapport avec cette question, nous nous arrêterons sur chacune de ces espèces separément.

H. nana. — Au cours de la période du 1 novembre au mois d'avril, nous trouvions ce parasite seulement chez *C. citellus* qui n'ont pas dormi ou qui ont dormi moins de 10 jours. Si nous prenons ceci en considération, alors il ne sera pas difficile d'expliquer l'absence complète de ce parasite du mois de janvier au mois de juin. Par conséquent, pour l'entretien de *H. nana* dans la nature, *C. citellus* n'est pas un hôte normal, malgré qu'il soit très sensible à l'infestation par ce parasite.

H. diminuta var. *citelli.* — Ce cestode se rencontre chez *C. citellus* non seulement pendant tous les mois de sa période active, mais également pendant tous les mois de sa période passive, mais avec la seule différence que dans cette dernière elle est considérablement moins fréquente. En observant au cours de la période passive l'inféstation des *Citellus* avec *H. diminuta* var *citelli,* nous avons remarqué que ce parasite a disparu chez tous les animaux qui ont dormi 20 à 25 jours sans interruption de sommeil. Par conséquent, *H. diminuta* var. *citelli* est considérablement plus résistant à l'abaissement de la température de son hôte, au cours de la période de l'hibernation en comparaison avec *H. nana*. La présence de *H. diminuta* var. *citelli* chez les *Citellus* examinés au mois de janvier, février et mars est la preuve, qu'ils ont dormi moins de 20 jours sans interruption de sommeil. En vertu de ce caractère, nous avons conclu que les *Citellus* hibernant dans la nature ne dorment pas aussi continuellement.

Gongylonema longispiculum. — Au cours de l'hibernation du *C. citellus*, ce nématode se comporte semblablement à *H. diminuta* var. *citelli* avec la seule différence, qu'il est encore plus résistant à l'abaissement de la température de son hôte. En effet, ce parasite disparait seulement chez les *Citellus*, qui ont dormi plus de 30 jours sans interruption du sommeil. Mais, comme le nombre de tels *Citellus* est limité, alors il n'est pas difficile d'expliquer la grande fréquence de *Gongylonema longispiculum* au mois de mars c'est à dire au moment de la sortie de ces rongeurs de leur trous hibernaux.

Streptophagus kutassi. — Ce nématode est très sensible à l'abaissement de la température de son hôte et à ce point de vue il se comporte comme *H. nana*. Ce parasite s'entretient d'une année à l'autre chez son hôte intermédiaire.

Trichostrongylus sp. — Ce nématode est également sensible à l'abaissement de la température de son hôte et 10 jours de sommeil continu suffisent pour débarasser *C. citellus* de ce parasite. Par conséquent, il ne s'entretient pas chez ce rongeur d'une année à l'autre.

Monilia moniliformis. — Ce parasite se rencontre chez *C. citellus* non seulement au cours de la période active de ce rongeur, mais également pendant son hibernation, avec le seule différence qu'il est au cours de cette dernière considérablement plus rare, grâce à l'influence de l'abaissement de la température. Mais, pour que les *Citellus* infestés par ce parasite puissent s'en débarasser, il faut qu'il dorme au moins 20 à 25 jours sans interruption de sommeil. A ce point de vue, il se comporte comme *H. diminuta* var. *citelli.* Cet acanthocephale s'entretient d'une année à l'autre à la fois chez *C. citellus* et chez les arthropodes — les hôtes intermédiaires.

Macracanthorhynchus hirudinaceus. — Durant la période de l'hibernation, ce parasite, grâce à la grande sensibilité à l'abaissement de la température de son hôte, ne se rencontre que pendant le mois de novembre. Pour cet acanthocephale, comme nous l'avons dit antérieurement, *C. citellus* n'est pas l'hôte normal.

Quant aux formes larvaires des cestodes, parasitant chez *C. citellus* de Vojvodina, l'abaissement de la température de ce rounger au cours de son sommeil hibernal n'a pas aucune influence sur la vie de ces parasites, étant donné que nous les avons trouvés pendant tous les mois de l'hiver.

RESUME

Les endoparasites de *C.citellus* de Vojvodina réagissent différemment à l'abaissement de la température au cours du sommeil hibernal de ce rongeur.

Au cours de la période d'hibernation de *C.citellus*, les protozoaires intestinaux et les trypanosomes du sang ne disparaissent pas sans égard au degré de l'abaissement de la température et sa durée.

Les formes adultes de toutes les espèces d'helminthes sont sensibles à l'abaissement de la température du *C.citellus*, mais leur sensibilité à ce facteur est différente chez les différentes espèces. Ainsi par exemple *H.nana*, *Streptophagus kutassi*, *Trichostrongylus* sp., et *Macracanthorhynchus hirudinaceus* sont considérablement plus sensibles en comparaison avec *H.diminuta* var.*citelli*, *M. moniliformis* et surtout *Gongylonema longispiculum*.

Les formes larvaires des cestodes de *C.citellus* ne sont pas influencées par l'abaissement de la température de leurs hôtes.

RIASSUNTO

Gli endoparassiti di *C.citellus* della Vojvodina reagiscono diversamente all'abbassamento della temperatura nel corso del sonno invernale del loro ospite.

Nel corso del periodo di ibernazione di *C.citellus* i protozoi intestinali ed i tripanosomi ematici non scompaiono, e ciò senza riguardo al grado di abbassamento della temperatura ed alla durata di esso.

Tutte le specie di elminti di *C.citellus* sono allo stadio adulto sensibili all'abbassamento della temperatura dell'ospite, ma la sensibilità varia da specie a specie. *H.nana*, *Streptophagus kutassi*, *Trichostrongylus* sp. e *Macracanthorhynchus hirudinaceus* sono p. es. notevolmente più sensibili di *H.diminuta* var. *citelli*, *M. moniliformis* e soprattutto *Gongylonema longespiculum*.

Le forme larvali dei Cestodi di *C.citellus* non sono influenzate dall'abbassamento della temperatura del loro ospite.

SUMMARY

The endoparasites of *C.citellus* from Vojvodina react differently to the lowering of temperature during hybernation of their host.

During hybernation of *C.citellus*, the intestinal *Protozoa* and blood *Trypanosoma* do not disappear, with disregard to the degree of temperature lowering and to its duration.

All species of helminths of *C.citellus* are sensitive, in the adult stage, to the lowering of the host temperature, but this sensitivity varies among the species. *H.nana*, *Streptophagus kutassi*, *Trichostrongylus* sp. and *Macracanthorhynchus hirudinaceus* are, for instance, markedly more sensitive than *H.diminuta* var. *citelli*, *M.moniliformis* and especially more sensitive than *Gongylonema longespiculum*.

The larval forms of *Cestoda* from *C.citellus* are not influenced by the lowering of the host temperature.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brumpt E. (1949): Précis de Parasitologie, Masson & C., Paris, I, 33.
2. Sassuchin D. (1931): Zum Studium der Darmprotozoenfauna der Nager im Süd-Osten RSFSR. I. Darmprotozoen des *Citellus pygmaeus* Pallas. *Arch. Protistenk.* *LXXIV*, 417-428.
3. Simitch Tsch., Teodorovitch S. (1951): Les parasites intestinaux du *Citellus citellus* de Yougoslavie au cours de l'hibernation et pendant la vie active de ce rongeur. I. Protozoaires intestinaux du *C.citellus* en hibernation. *Ann. de Parasitologie*, *XXVI*, 381-388.
4. Simitch Tsch., Petrovitch Zl. (1953): Parasites intestinaux du *Citellus citellus* de Yougoslavie au cours de l'hibernation et de la vie active de ce rongeur. II. Protozoaires intestinaux du *C.citellus* en hibernation (*suite*). *Ann. de Parasitologie*, *XXVIII*, 29-32.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DELL'ACAROFAUNA DI ROMA E DINTORNI. — III. SOTTORDINI *TETRAPODILI, SARCOPTIFORMES* E *PROSTIGMATA*

OLEG STARKOFF (*)

La presente nota è destinata a completare quelle da me precedentemente pubblicate sul medesimo argomento (ved. bibliografia) e si basa sulle osservazioni più recenti, riguardanti i Sottordini: *Tetrapodili* Bremi, *Sarcoptiformes* Reuter e *Prostigmata* Kramer.

Sottordine *TETRAPODILI* Bremi, 1872

Fam. ERIOPHYIDAE Nalepa, 1898

Eriophyes vitis (Landois, 1868)

Numerosi esemplari da foglie di vite (*Vitis vinifera*), con alterazioni caratteristiche, fornitemi gentilmente dal Prof. A. CICCARONE e raccolte a Casal de' Pazzi nell'agosto 1950.

Fam. PHYLLOCOPTIDAE Nalepa, 1898

Vasates lycopersici (Massee, 1937)

Questo parassita reca gravi danni alle piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) determinando un particolare essiccamento dell'apparato fogliare con arresto dell'accrescimento ed una colorazione rossiccio-bronzea, donde il nome inglese: « tomato russet mite ». Si determinano perdite oscillanti fra i 50 ed il 100% del prodotto.

Gli Acari in parola vennero rinvenuti, per la prima volta nei pressi di Roma, nel novembre 1950 a Casal de' Pazzi dal Prof. A. CICCARONE, che sentitamente ringrazio per avermi fornito questo materiale.

(*) *Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma* (Direttore: Prof. E. BIOCCA).

Sottordine *SARCOPTIFORMES* Reuter, 1909

Fam. ANALGESIDAE Trouessart, 1915

Protalges psittacinus Trouessart, 1885

Ne risultarono parassitati i seguenti uccelli del Giardino Zoologico di Roma: *Neopsephotus bourkei* (V-1950), *Neophema venusta* (V-1950), *Neophema elegans* (V-1950), *Psephotus multicolor* (V-1950) e *Melopsittacus undulatus* (II-1951).

Fam. DERMOGLYPHIDAE Mégnin et Trouessart, 1883

Protolichus velifer Trouessart, 1884

Rinvenuti, in scarso numero, insieme alla specie precedente, sui medesimi uccelli.

Dermoglyphus sp.

Rarissimi esemplari su *Neophema venusta* (V-1950).

Fam. EPIDERMOPTIDAE Trouessart, 1892

Dermatophagoides crassus (Canestrini, 1894)

Rari esemplari su *Liothrix lutea* (I-1951).

Rivotasia dermicola (Trouessart, 1886)

Rarissimi esemplari, insieme alla specie precedente, sul medesimo uccello.

Tutti gli Acari appartenenti alle tre ultime Fam., e raccolti sugli uccelli del Giardino Zoologico, mi sono stati forniti dal Dott. E. BRONZINI che sentitamente ringrazio, insieme al Dott. J. GAUD dell'Istituto d'Igiene del Marocco per avermi gentilmente agevolato nella determinazione di alcune specie.

Fam. ACARIDAE Latreille, 1802

Sarcoptes canis Gerlach, 1857

Da un tipico caso di rogna sarcoptica del cane, osservato nel febbraio 1953.

Sottordine *PROSTIGMATA* Kramer, 1877

Fam. PTERYGOSOMIDAE Oudemans, 1910

Geckobia loricata Berlese, 1892

Rari esemplari, misti a molti della specie *Geckobia latasti* Mégnin, 1878, su *Tarentola mauritanica* (Villa Borghese, IV-1945).

RIASSUNTO

L'A. presenta un elenco supplementare di Acari, appartenenti ai Sottordini *Tetrapodili*, *Sarcoptiformes* e *Prostigmata*, rinvenuti a Roma e nei dintorni.

SUMMARY

The author reports a supplementary list of mites, belonging to the Suborders *Tetrapodili*, *Sarcoptiformes* and *Prostigmata*, collected in Rome and surroundings.

BIBLIOGRAFIA

(Vengono citate solo le pubblicazioni più recenti. Per quelle precedenti vedi i lavori di STARKOFF O.).

BAKER E.M., WHARTON G.W. (1952): An introduction to Acarology. Ed. The Macmillan Company, New York.

CICCARONE A., CARILLI A. (1951): Nota preliminare sulle osservazioni attualmente in corso intorno ad alcuni avvizzimenti del pomodoro, con qualche cenno sull'azione di un eriofide: *Vasates destructor* (K.). *Boll. Staz. Pat. Veget.*, 7, 1-27 (in estratto).

GAUD J. (1952): Sarcoptides plumicoles des oiseaux de Madagascar. *Mém. Inst. Scient. de Madagascar*, 7, 81.

GAUD J., PETITOT M.L. (1948): Sarcoptides plumicoles des oiseaux du Maroc. *Ann. de Parasitol.*, *23*, 35.

GAUD J., PETITOT M.L. (1948): Sarcoptides plumicoles dés oiseaux d'Indochine. *Ann. de Parasitol.*, *23*, 337.

RADFORD C.D. (1950): Systematic check list of mite genera and type species. Ed. Union Intérnationale des Sciences Biologiques, Paris.

RADFORD C.D. (1950): The mites (*Acarina*) parasitic on mammals, birds and reptiles. *Parasitology*, *40*, 366.

RADFORD C.D. (1953): The mites (*Acarina*: *Analgesidae*) living on or in the feathers of birds. *Parasitology*, *42*, 199.

STARKOFF O. (1949): Contributo alla conoscenza dell'acarofauna di Roma e dintorni. 1ª nota: Fam. *Argasidae* Murray, 1877. *Atti Accad. Naz. dei Lincei*, 7, 120.

STARKOFF O., STARKOFF I. (1950): Contributo alla conoscenza dell'acarofauna di Roma e dintorni. 2ª nota: Sottordini *Sarcoptiformes* e *Prostigmata*. *Riv. di Parassitologia*, *11*, 85.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

ON *ANOPHELES PLUMBEUS*

N. H. SWELLENGREBEL (*)

The term *urban malaria* implies more than the presence of indigenous malaria in cities.

As a rule, malaria is a rural disease, the breeding places of anopheles requiring rural conditions rather than urban. The outskirts of a city lie open to the invasion of *Anopheles* hatched in rural breeding places; these outskirts protect the centre from being invaded, unless the city is a small one, or the breeding places surrounding it produce anopheles in inordinate numbers. Conditions like these, with rural anopheles overrunning part, or the whole, of a city, are not to be classified as urban malaria. Neither are those in which the city is a huge garden-city, as in some Indonesian cities before 1941; or in which the centre of the city has been laid waste by some catastrophe, as in Middelburg (island of Walcheren), where DE BUCK and VANTHIEL in 1942, found shortwinged *maculipennis* breeding in large numbers in water contained in the uncovered cellars of houses destroyed, by German bombing, right in the middle of the town.

On the other hand, the term is appropriate to malaria transmitted within a city by an anopheline species adapted to breeding places peculiar to that city, and widely different from those prevailing in the rural area surrounding it. That was the case of Jerusalem, with *A. claviger* breeding in cisterns, and of Bombay, with *A. stephensi* breeding in closed iron tanks, and deep wells in the courtyards of houses. These are examples of truly urban malaria.

According to this definition, indigenous vivax malaria recently discovered in London (CROCKER & SIMPSON, 1953) is not urban, as it is believed to be transmitted by *A. plumbeus*, a species of which SHUTE (1954) states that « although *A. plumbeus* is frequently described as a forest mosquito, it is quite common in parks, and other places in large towns where suitable water holding cavities occur in trees ».

(*) *School of tropical hygiene & geographical pathology. Royal Tropical Institute, Amsterdam.*

The city of Amsterdam offers a different picture, as may be recalled by those members of the 3d international congress of tropical medicine (September, 1938) who were shown a breeding place of *A. plumbeus* which neither conformed to the forest type nor to that described by SHUTE. This breeding place was a concrete trough built in the basement of the Institute of Tropical Hygiene, situated in such a fashion that rainwater seeped into it and the wind carried dead leaves in its direction. It had to be reached through an opening in a brick wall, just wide enough for a man to slip through. Larvae of *A. plumbeus,* but of no other species of mosquito, were present in considerable numbers for several weeks, providing the late dr A. DE BUCK with a continuous supply.

A few adults only were found within the lavatories of the building; but that was to be expected, as it was not occupied during the night. Adults were absent from the brick outhouse lodging laboratory animals, which was routinely inspected for the presence of anopheles.

As is well known, the city of Amsterdam is periodically attacked by malaria. The sections most affected are the outskirts, where the city expands into a rural environment with prolific breeding places of shortwinged maculipennis, but deficient in the animal habitations which characterize rural areas unaffected by urban expansion.

Nevertheless, a certain number of cases of malaria are annually detected among the inhabitants of the old town within the former city walls, and separated from the rural surroundings by a broad belt of newer houses. Out of 12,037 cases diagnosed as malaria since 1922, and confirmed by blood examination, 647 occured within the old town, i. e. about 1 in 18, among a population of about one sixth of that of the whole city. Not all of these 647 acquired their infection within the precincts of the old town. It is safe to say that a majority, perhaps even a large one, of these persons were infected elsewhere, but certainly not all of them. Although it is impossible to evaluate the number of indigenous cases, comparable with the London cases quoted above, there can be no doubt as to their existence in the past.

In the old town there are few parks, but trees grow in a number of small private gardens at the back of the houses. Thus the possibility of plumbeus breeding in its natural habitat cannot be excluded, but artificial breeding places of the above description, independent from the presence of hollow trees, are much more likely to occur inside an old and densely built town than the natural type.

The case against *A. plumbeus* as a transmitting agent of malaria is not proven. If it ever should be, its rôle as an urban vector may turn out to be bound up with certain deviations from the ordinary pattern of larval behaviour, as is the case in *A. claviger* in areas where it is acting as an urban vector.

SUMMARY

Description of an unusual type of breeding place of *Anopheles plumbeus* which, in that particular instance, marked this species as truly urban. Discussion of the significance of the term *urban malaria*.

RIASSUNTO

L'A. descrive un non abituale tipo di focolaio di *Anopheles plumbeus* che, in questo caso particolare, qualifica tale specie come veramente urbana. Discute altresì il significato della dizione *malaria urbana*.

BIBLIOGRAPHY

CROCKETT G. S. & SIMPSON K. (1953): *Brit. Med. J., 1st half*, 1141.

SHUTE P. G. (1954): *Monthly Bull. Ministr. Health & Pub. Hlth. Lab. Serv., 13*, 48-51.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

LOTTA CONTRO LA FORMICA ARGENTINA (*IRIDOMYRMEX HUMILIS* MAYR) IN ITALIA

MARIO TIRELLI

G. B. GRASSI ebbe il merito di dare inizio all'insegnamento della Entomologia agraria nella Facoltà di Scienze della Università di Roma. Noi che lo avemmo maestro anche di questa materia (allora detta facoltativa, ora complementare) negli ultimi anni di Sua vita, materia che Egli stesso insegnava coadiuvato dalla Prof. LIDIA LA FACE, allora assistente del GRASSI, ricordiamo quanto amore e quanto interessamento il GRASSI ponesse nello insegnamento di tale disciplina, seguita, purtroppo da pochi studenti.

Fu allora che imparammo, per la prima volta, (era nel 1922-23, se ben ricordiamo) a riconoscere e a combattere la Formica argentina, che già stava procurando fastidi alla popolazione di alcuni centri del Lazio ed anche della stessa Roma, e danni all'agricoltura. Ed imparammo anche a preparare lo sciroppo avvelenato, a base di miele ed arsenico, sulla base della formula suggerita dagli AA. americani (BARBER e CROSS). Ulteriori progressi vennero fatti in seguito nella preparazione di tale sciroppo, nel quale al costoso miele, che sopratutto agiva per la sua attrattività verso le formiche, poterono essere sostituite altre sostanze.

Dal 1923 ad ora avemmo occasione, prima della guerra e dopo, di sperimentare e applicare vari mezzi di lotta contro la Formica argentina, organizzando o dirigendo tecnicamente la lotta stessa su alcune migliaia di ettari, nel Lazio.

In questa breve nota vengono prospettati in succinto, senza dilungarsi sulla biologia dell'insetto, i risultati di questa nostra esperienza in materia.

La Formica argentina (*Iridomyrmex humilis*) (1) venne introdotta in Italia all'inizio del secolo e si è, a poco a poco, sparsa in: Liguria, Lazio, Campania,

(1) Il nome di Formica argentina (Argentine ant) fu dato a questa specie dal MAYR, che la descrisse su esemplari provenienti dall'Argentina, ma sembra che il territorio di origine sia il Brasile. Il nome, quindi, col quale la specie è universalmente nota, è inesatto.

Calabria, Sicilia. Preferisce i terreni fertili, ben coltivati, non troppo aridi.

Molti e vari metodi sono stati applicati per combattere questa specie. Le trappole, costituite da vasi di vetro nei quali le formiche, cercando di raggiungere un'esca collocata su un filo di ferro, piegato in modo opportuno, vanno a cadere e altri mezzi (ossa spolpate che attirano le formiche e che poi si raccolgono, gettandole in acqua bollente) ecc. debbono considerarsi mezzi di fortuna, utili per piccole superfici e se manca la possibilità di eseguire la lotta in modo diverso.

Il metodo delle esche zuccherine avvelenate dà sempre buoni risultati, ma è specifico per la sola formica argentina. Qualche altra specie di formica può essere attratta. L'arsenico deve essere in piccola dose altrimenti l'esca è repellente per le formiche. Si è tuttavia osservato che talune di tali esche preparate per il commercio non avevano sufficiente attrattività per le formiche; quindi, prima di usare nella lotta anzidetta un nuovo prodotto del genere e di acquistarne in quantità, è necessario saggiarne l'efficacia, altrimenti si potrebbe andare incontro a insuccessi.

Il modo per somministrare l'esca può variare; in sostanza si tratta sempre di distribuire l'esca in recipienti di cui sono state studiate forme e modalità varie di costruzione (recipienti di terracotta, di vetro, di cartone paraffinato, scoperti o coperti, o pezzi di canna, ecc.), ciascuna delle quali ha pregi e difetti e può risultare più o meno conveniente a seconda anche della natura del terreno da disinfestare, della superficie, ecc. Per ottenere buoni risultati si deve assicurare una distribuzione di numerosi *punti d'esca* sul terreno, si deve evitare eccessiva evaporazione dell'esca dai recipienti, assicurando, inoltre, l'accesso delle formiche nei recipienti stessi. Si possono anche usare, per piccole superfici, mezzi di fortuna: pezzi di coccio o vetro o foglie secche su cui si versano piccoli quantitativi di esca.

Le esche avvelenate risultano particolarmente efficaci se distribuite nella stagione tiepida, quindi in primavera e a fine estate o in autunno. Durante la stagione calda le formiche sono meno attive e meno attratte dall'esca, che evapora anche più rapidamente.

La lotta invernale con recipienti trappola (vasi di terracotta, cassette e simili), ripieni di sostanze fermentescibili (letame, paglia, ecc.) che, appunto fermentando, producono calore e attirano quindi le formiche nel recipiente, che poi si disinfesta, quando è pieno di formiche, con solfuro di carbonio, o con altri mezzi chimici o fisici, è molto meno usata di una volta, perchè laboriosa in confronto dei moderni metodi più rapidi, a mezzo di contattocidi.

Il metodo ora più usato è la lotta primaverile-estiva mediante contattocidi. Tale metodo è stato impiegato, in Italia, solo dopo la guerra, ma per la sua semplicità è ora preferito in genere dagli agricoltori. Con questo metodo basta spruzzare il terreno, ed eventualmente il colletto delle piante arboree, le pareti esterne degli edifici, recinzioni, staccionate,ecc., per circa mezzo metro dal ter-

reno, con un contattocida opportunamente diluito in acqua. Si usano pompe irroratrici comuni (a mano o a motore e di qualsiasi tipo) al cui impiego l'agricoltore è da tempo abituato, spruzzando con esse le superfici anzidette. La disinfestazione, in tal modo, risulta di più facile attuazione. Il trattamento del terreno mediante contattocidi è anche meno pericoloso, dal punto di vista dei danni agli insetti utili, dei trattamenti a piante, sopratutto arboree.

Possono usarsi, come contattocidi, sostanze diverse; sono stati sperimentati o applicati su vasta scala: DDT, clordano (octacloro), gamma (HCH o BCH o 666), lindano, eptacloro, aldrina, dieldrina. Ognuna di dette sostanze attive è stata sperimentata e applicata in varia preparazione: preparati emulsionabili, preparati diluibili in acqua in forma colloidale, polveri bagnabili, ecc.

Il DDT, pur efficace, risulta costoso, perchè occorre una dose cospicua di sostanza attiva per ettaro ed anche, pertanto, una considerevole quantità di acqua per diluirlo. Il gamma non dà sempre buoni risultati e sembra agisca più come insettifugo che come insetticida. Clordano, eptacloro e dieldrina hanno dato i migliori risultati. Sono efficaci in dosi di pochi Kg. ad ettaro, si ha quindi non solo un risparmio di insetticida ma anche un risparmio per l'acqua, in quanto ne basta la quantità minima indispensabile per il trattamento. Col clordano conviene effettuare due trattamenti (ciascuno con circa 3 Kg. di sostanza attiva-ettaro), il primo non appena si nota attività nelle formiche, il secondo a distanza di 25-30 giorni dal primo. Con la dieldrina anche un solo trattamento può bastare (Kg. 1 di sostanza attiva-ettaro), almeno in taluni casi. Ma per tale ultima sostanza occorre, in Italia, una ulteriore sperimentazione per indicare, nel caso della lotta contro la formica argentina, delle dosi definitive di impiego.

Taluni pensano che la Formica argentina possa eradicarsi, sia col metodo delle esche avvelenate impiegato intensamente, sia col metodo dei contattocidi applicati in dosi massiccie.

Da quanto ci risulta, e per le condizioni del Lazio, crediamo che ciò possa ottenersi su superfici limitate, le quali risulteranno libere da formiche per alcuni anni sino a che, a poco a poco, verranno nuovamente invase dalla periferia. Ma non può, a nostra opinione, ottenersi una eradicazione completa della specie, in Italia, in quanto dovrebbero trattarsi in modo intenso tutte le zone ore infestate, con densità maggiore o minore, dalla predetta specie. E ciò risulterebbe molto costoso, mentre non è escluso che possa sempre sfuggire dalla disinfestazione eradicante qualche focolaio, il quale diverrebbe il punto di partenza di una nuova infestazione.

In pratica, quindi, e allo stato attuale, conviene effettuare un controllo della specie, con trattamenti ripetuti almeno ogni 2-3 anni, in modo da contenerla in limiti sopportabili. In alcune zone di limitata superficie, con trattamenti più intensi, può ottenersi una scomparsa o una diminuzione della specie per un periodo di tempo più prolungato.

RIASSUNTO

Nella lotta contro la formica argentina, in Italia, al sistema delle esche dolci avvelenate e al sistema di lotta invernale mediante recipienti trappola (che tuttora danno buoni risultati) si è aggiunto il metodo dei contattocidi, impiegato su larga scala nel dopoguerra. Da applicazioni su alcune migliaia di ettari e da sperimentazioni molteplici risulta allo scrivente che i contattocidi più idonei dal punto di vista, anche economico, sono: il clordano, l'eptacloro, la dieldrina.

SUMMARY

Contact insecticides, used largely after World War II, have been introduced in Italy to control *Iridomyrmex humilis* Mayr in addition to the already known poisonous baites and to the winter control methods through traps (which still give good results). The author, on the basis of several thousands hectares treated personally with contact insecticides and of many laboratory experiments, believes that the most practical and economic substances are chlordane, heptachlor and dieldrin.

NOTA BIBLIOGRAFICA.

Elenchi bibliografici sulla formica argentina, si possono trovare nei seguenti lavori:

GHIDINI G. M. (1948): Considerazioni e proposte sul controllo della formica argentina. *Rivista fitosanitaria*, 2, 33-41.

PAOLI G. (1948): Le formiche delle case e dei giardini. *ibidem*, 2, 14-21.

TIRELLI M. e MADALUNI A. L. (1949): La formica argentina (*Iridomyrmex humilis* Mayr) nel Lazio. Sperimentazione di nuovi metodi di lotta. *ibidem*, 3, 1-26.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

ON SOME TREMATODES OF MARINE FISHES FROM NEW ZEALAND

L. S. YEH (*)

By permission of the Trustees of the British Museum (Natural History), a collection of trematodes obtained from marine fishes in New Zealand was placed at my disposal for examination. There are few published records of trematodes from marine fishes in that country, although several papers on trematodes from fishes in Australia have been published by various workers.

The material examined was collected more than twenty years ago, and includes a wide variety of forms; but as some of the tubes contained only one or two specimens, which are not in excellent preservation, we report on two species where the material is abundant and in a good enough condition for a detailed study based on serial sections and stained whole mounts. Further, a third species, which was easily recognizable, is also recorded.

It is interesting to note that *Tubulovesicula angusticauda* was first recorded from Queensland, Australia in 1915 by Nicoll, in Japan in 1934 by Yamaguti, and is now reported from New Zealand. Other species of this genus have since been reported from other continents. We also report *Grassitrema prudhoei* gen. et sp. nov., which is interesting by the fact that the pre-oral lip has a small « pre-oral sucker ». *Ptychogonimus megastoma* (Rud., 1819) Lühe, 1900, which is one of the well-known European species, has been reported by Hanson (1950) from Bermuda and in this paper from New Zealand.

Family Hemiuridae Lühe, 1901.

Tubulovesicula angusticauda (Nicoll, 1915) Yamaguti, 1934.

Synonym: *Tubulovesicula muraenesocis* Yamaguti, 1934.

In a tube labelled « stomach of B & Silver eels » (Black and Silver eels = *Anguilla dieffenbachii* Gray and *Anguilla australis schmidtii* Phillipps,

(*) *Department of Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine.*

respectively) there was a large number of flukes which were found to consist of *Tubulovesicula angusticauda* (Nicoll, 1915) and *Grassistrema prudhoei* gen, et sp. nov. They were collected in September, 1933, in Otago Harbour, New Zealand.

The former are small, conical and spindle-shaped. The body proper measures 1.9-3.1 mm. in length and 0.77-1.25 mm. in width. In most of the specimens, the ecsoma is retracted, and measures about 0.86 mm., but in one specimen it measures 1.78 mm., not fully everted.

The cuticle is smooth and without any trace of transverse plications. The preoral lip is 0.047-0.078 mm. long. The subterminal oral sucker measures 0.21-0.37 × 0.15-0.33 mm. and the ventral sucker 0.39-0.61 × 0.35-0.61 mm. The latter is situated 0.39-0.63 mm. from the anterior end of the worm. Between the two suckers there is a distinct concavity. The pharynx measures 0.09-0.16 × 0.07-0.14 mm. The oesophagus is very short. The intestinal caeca terminate in slight coils in the invaginated ecsoma.

The sub-spherical testes are dispersed symmetrically at the posterior border of the ventral sucker. They measure 0.19-0.29 × 0.15-0.22 mm. The twisted seminal vesicle is without divisions, but varies in diameter. The pars prostatica, 0.26-0.40 mm. starts from about the level of the middle of the ventral sucker and is heavily invested with large prostatic cells. The sinus-sac is 0.20-0.30 × 0.12-0.20 mm.

The oval to kidney-shaped ovary is median and lies slightly posterior to the ventral sucker. It measures 0.22-0.30 × 0.09-0.12 mm. In the vicinity of the ovary the well-developed vitellaria consist of seven rather thick tubes, three of which are on the left and four on the right side. In most cases, the fourth lobe or tube on the right takes a more median position towards the posterior. The uterine coils descend in the left and ascend in the right field of the body, to continue between the two testes, keeping ventral to the seminal vesicle and pars prostatica. The metraterm enters the sinus-sac postero-dorsally to join the male duct and form the genital sinus, with the genital pore opening at the level of the pharynx. The operculated eggs are oval, thick-shelled and measure 29-40 × 22-29 microns.

Tables 1 gives the measurements from the three authors.

Discussion.

Nicoll (1915) described this species from a single specimen recovered from an eel, *Muraenesox cinereus,* from Queensland, Australia. He placed it in the genus *Ectenurus* Looss, 1907, which it resembles more closely than any other genus, but remarked that « the terminal male genitalia do not quite resemble those in *Ectenurus lepidus,* the type of the genus ».

Yamaguti (1934) described three new species from Japanese waters and

TABLE 1

Name of Parasite / Host	NICOLL (1915) *Ectenurus angusticauda* / *Muraenesox cinereus*	YAMAGUTI (1934) *Tubulovesicula muraenesocis* / *Muraenesox cinereus*	YAMAGUTI (1940) *Tubulovesicula muraenesocis* / *Lophius litulon* *Inimicus japonicus* *Conger myriaster*	YEH (present paper) *Tubulovesicula angusticauda* / Either *Anguilla dieffenbachii* or *Anguilla australis schmidtii*
Length	3.1	3.15–5.18	4.0–11.3	1.9 –3.1
Width	1.15	1.0–1.47	0.65–1.5	0.77–1.25
Pre-oral lip	—	0.06	—	0.047–0.078
Oral sucker	0.22	0.25–0.42 × 0.29–0.46	0.27–046 × 0.33–0.5	0.15–0.33 × 0.21–0.37
Ventral sucker	0.44	0.47–0.9 × 0.53–0.9	0.52–0.9	0.35 0.61 × 0.39–0.61
Ventral sucker from anterior	0.88	—	—	—
Pharynx	—	0.12 × 0.16	0.13–0.23 × 0.13–0.2	0.07–0.14 × 0.09–0.16
Testes	R. 0.09 × 0.15 Spherical	L & R 0.2–0.3 × 0.2–0.38 Oval	L & R 0.26 0.4 × 0.24–0.31 subglobular	L & R 0.15–0.22 × 0.19–0.29 subspherical
Seminal vesicle	Tubular, ending in front of testes. No division	Voluminous, ending in front of testes. No division	Tubular, winding, extending over acetabulum	Diameter variable, ending in front of testes. No division
Pars prostatica	0.25 Starting anterior tip of ventral sucker	— Starting middle of ventral sucker	—	0.26–0.40 Starting middle of ventral sucker
Caeca	?	To posterior extremity of ecsoma	To posterior end of tail	To posterior extremity of ecsoma
Sinus sac	0.15	0.21–0.14	0.2–0.3 × 0.15–0.25	0.20–0.30 × 0.12–0.20
Ovary	0.15 × 0.18 Round, median	0.14–0.22 × 0.24 × 0.34 Kidney-shaped, left of median	0.188–0.25 × 0.25–0.34 Transversely, elongate oval One side of median	0.09–0 12 × 0.22–0 30 Oval to kidneys-haped. Median
Ovary from ventral sucker	0.1 posterior to ventral sucker	—	—	—
Vitellaria	L. 3 lobes R. 4 lobes Situated horizontally	L. 3 lobes R. 4 lobes spreading horizontally	—	L. 3 lobes R. 4 lobes situated horizontally
Eggs	28–30 × 22–23 microns	34–39 × 26–29 microns	33–54×24–33 microns	29–40 × 22–29 microns

found sufficient characters to erect a new genus, *Tubulovesicula,* stating that *Ectenurus angusticauda* should be transferred to this genus.

A close study of the present material shows that it is doubtless the species described by NICOLL (1915) as *Ectenurus angusticauda,* although it does not agree entirely with his description. NICOLL's single specimen appears to be a juvenile form flattened under pressure. The above specimens were fixed without any pressure, and it was therefore to be expected that some of the measurements were found to be less than those given in the description of the Japanese material. YAMAGUTI (1934) described as new *Tubulovesicula muraenesocis* from the stomach of *Muraenesox cinereus* from Japan. He says it is closely related to *Tubulovesicula angusticauda* (Nicoll, 1915) from *Muraenesox cinereus,* but differs in the size of the eggs and in the posterior extent of the vesicula seminalis and pars prostatica. In his redescription of this parasite, obtained from various hosts in Japan, there were marked ranges in the size of the eggs. In the present study, we do not find any valid specific characters for separating *T. muraenesocis* from *T. augusticada* and it seems necessary to place it in synonymy with the latter.

Grassitrema prudhoei gen. et sp. nov.

A large number of these flukes were found in a tube labelled « stomach of B & Silver eels » (Black and silver eels = *Anguilla dieffenbachii* Gray and *Anguilla australis schmidtii* Phillipps, respectively). These eels were collected in September, 1933, in Otago Harbour, New Zealand.

The body is tubular, with the anterior and posterior ends terminating abruptly. The body proper measures 3.2-6.9 mm. in length and 1.1-1.5 mm. in width. The extended ecsoma is about the same length as the soma.

The thin cuticle has distinct transverse plications. The pre-oral lip is 0.09-1.96 mm. long. It has a small pre-oral sucker measuring 0.12-0.20 × 0.14-0.27 mm. On each side of the body, slightly posterior to the oral sucker there are two spherical bundles of « shoulder muscles », which in size are slightly smaller than the oral sucker. The subterminal oral sucker measures 0.93-0.68 × 0.34-0.57 mm. and the much larger ventral sucker 0.71-1.25 × 0.55-1.12 mm. Between the suckers there is a concavity. The pharynx measures 0.21-0.36-× 0.20-0.28 mm. The oesophagus is very short. At the beginning of each intestinal caecum, there is a small spherical glandular stomach. It has

e. e. Extended ecsoma; e. t. excretory duct; g. p. genital pore; g. s. genital sinus; i. e. invaginated ecsoma; int. intestine; l. lip; m. metraterm; oes. oeophagus; o. m. b. oblique muscle-bundle; o. s. oral sucker; ov. ovary; p. c. prostatic cells; ph. pharynx; p. p. pars prostatica; p. s. pre-oral sucker; p. v. prostatic vesicle; s. m. « shoulder muscle »; s. p. pre-somatic pit; sin. s. sinus-sac; s. v. seminal vesicle; su. m. sub-cuticular muscle; t. testis; vit. vitellaria; v. s. ventral sucker.

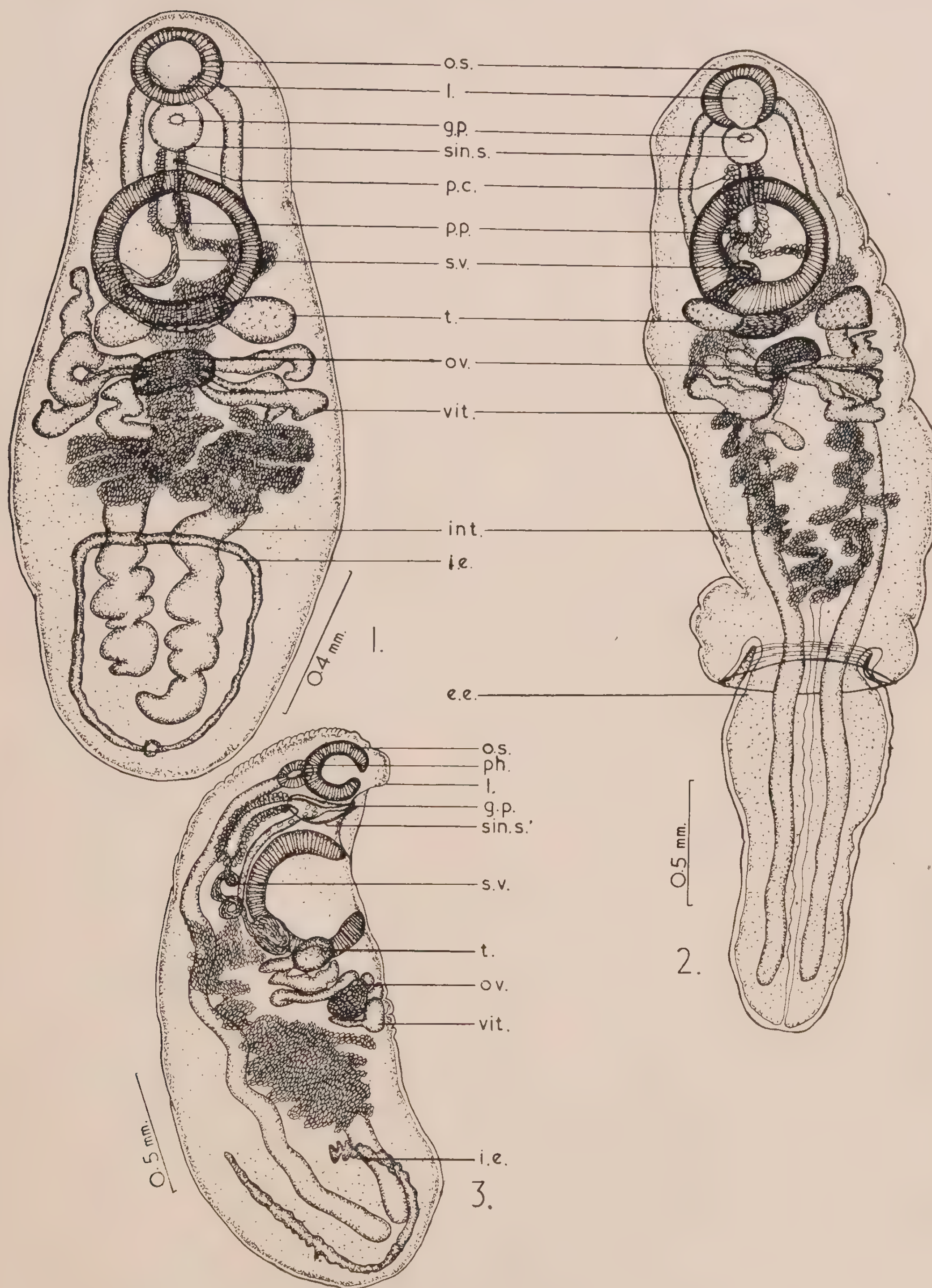


Fig. 1. - *Tubulovesicula angusticauda.* Ventral view, ecsoma retracted.
Fig. 2. - *T. angusticauda.* Ventral view, ecsoma extended.
Fig. 3. - *T. angusticauda.* Lateral view.

been suggested by JONES (1943, p. 55) that in *Sterrhurus fusiformis* this organ functions for regurgitation. The intestinal caeca terminate anterior to the invaginated ecsoma, but may extend half the length inside an extended ecsoma.

The small spherical testes measure 0.14-0.37 × 0.12-0.36 mm. and lie on the lateral sides of the posterior border of the ventral sucker. The undivided, voluminous, tubular seminal vesicle starts from a point slightly anterior to the hinder border of the ventral sucker and enters a short pars prostatica, which is completely surrounded by large prostatic cells. The pars prostatica opens with a spherical prostatic vesicle, which in turn joins the metraterm to form the genital sinus. This sinus has several muscles which are attached to the ventral surface of the worm. These muscles are probably used for the protrusion of the organ, which seems to take the place of the penis. There is no sinus-sac.

In the concavity between the two suckers, and slightly posterior to the genital opening, there is a presomatic pit, from which several bundles of muscles radiate postero-ventrally. Running obliquely postero-dorsal from the pit there is a large and powerful, oblique muscle-bundle.

The spherical ovary may lie either to the right or to the left of the median line. Where the ovary lies to the right, the vitellaria have four tubular processes extending over the right lateral side and three processes spreading ventro-posteriorly. A mirror-image of the right is found if the ovary is situated on the left. The uterine coils descend and ascend in a confused manner to fill much of the space between the invaginated ecsoma and the ventral sucker. In specimens where the ecsoma is extended, the uterus and caeca may or may not extend into it. There is a long metraterm measuring about 1 mm. in length which joins the male duct to form the genital sinus, with the genital pore opening on the level of the pharynx. The small, ovoid, thin-shelled eggs measure 18-24 × 11-13 microns.

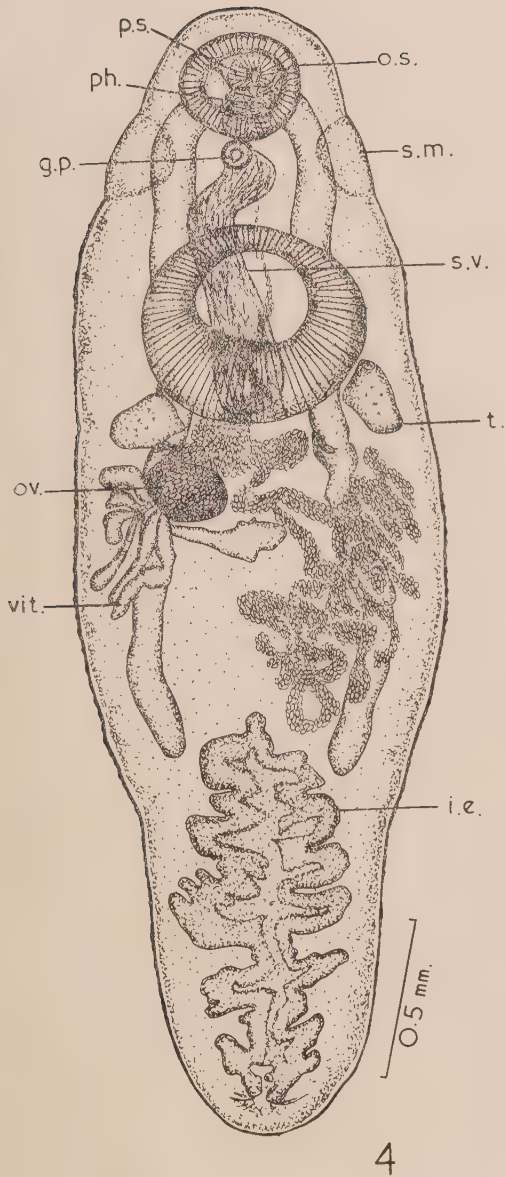
The writer proposes for this new genus and species the name *Grassitrema prudhoei*. The genus is named in honour of Professor B. GRASSI as a humble tribute to his invaluable contribution to science. The species is in honour of Mr. S. PRUDHOE, Head of the Platyhelminthes Section of the Department of Zoology, British Museum (Nat. Hist.), as a token of gratitude for the help and assistance he gave the writer in his work.

Type and para-type: Deposited with the British Museum (Nat. Hist.).

Host: Either *Anguilla dieffenbachii* Gray or *Anguilla australis schmidtii* Phillipps.

Habitat: Stomach.

Locality: New Zealand.



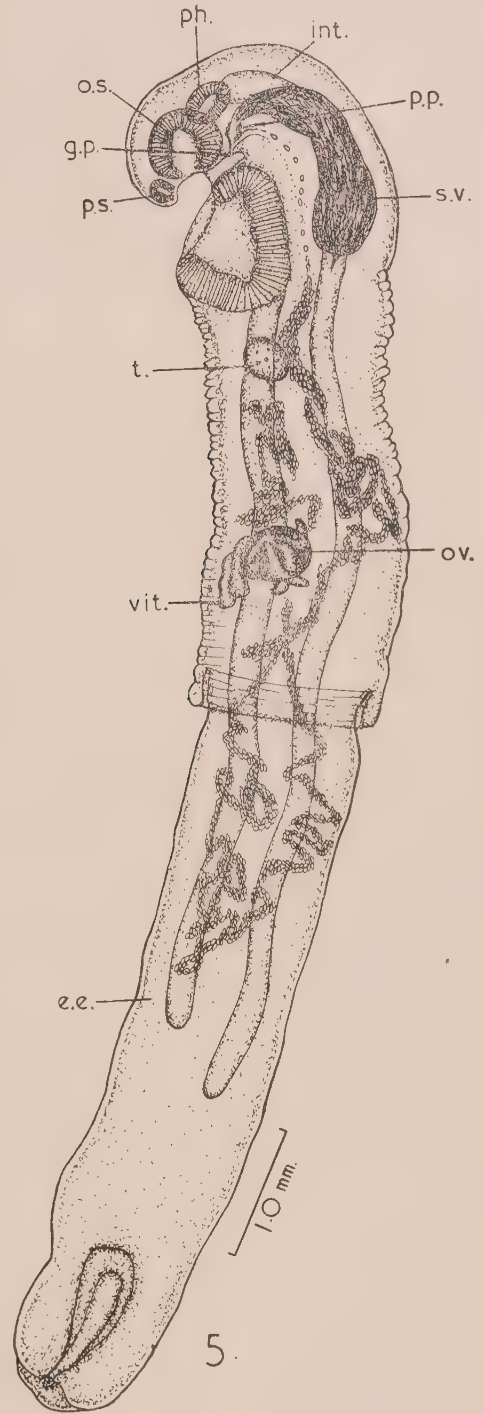


Fig. 4. - *Grassitrema prudhoei* gen. et sp. nov. Ventral view, ecsoma retracted.
Fig. 5. - *G. prudhoei.* Lateral view, ecsoma extended.

Generic diagnosis.

Hemiuridae Lühe, 1910. Body tubular or bluntly spindle-shaped, with ecsoma. Pre-oral lip with a small « pre-oral sucker ». Two powerful spherical « shoulder muscles » are present on the sides of the body between the oral and ventral suckers. Oral sucker subterminal, and opens directly into the pharynx. Oesophagus very short. Glandular stomach present. Caeca may extend into everted ecsoma. Ventral sucker larger than oral, in anterior third of body. Testes ventral, posterior to ventral sucker, symmetrically arranged more or less lateral to caeca. Seminal vesicle tubular, voluminous, without division. Pars prostatica short, completely surrounded by prostatic cells. Prostatic vesicle and genital sinus present. Sinus-sac absent. Pre-somatic pit present. Genital pore in region of pharynx. Ovary submedian, slightly posterior to testes. Seminal receptacle present. No Laurer's canal. Oötype and Mehlis' gland posterior to ovary. Vitellaria with seven tubular lobes. Uterus may or may not descend into ecsoma. Metraterm present. Eggs thin-shelled. Parasitic in marine fishes.

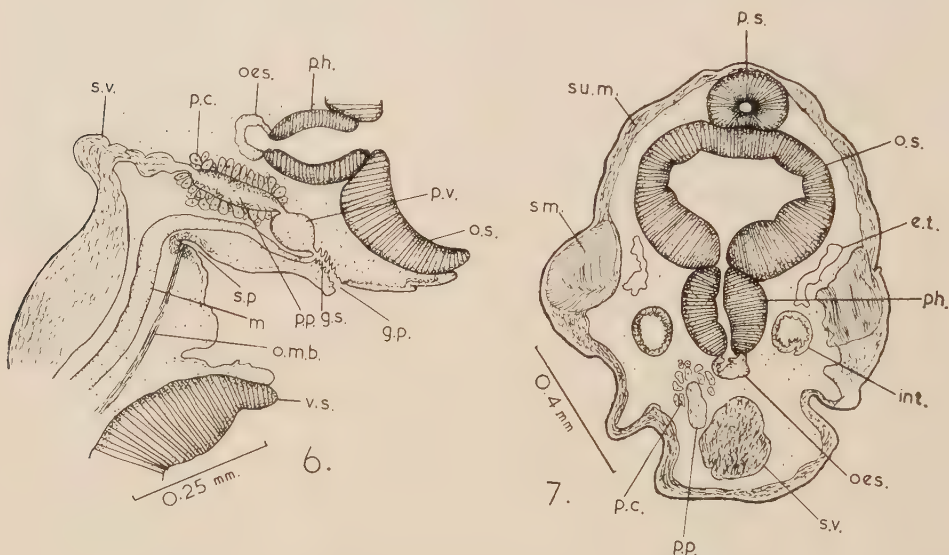


Fig. 6. – *G. prudhoei.* Diagram of terminal genitalia.
Fig. 7. – *G. prudhoei.* Cross-section through oral sucker.

Genotype: *Grassitrema prodhoei* sp. nov.

Discussion.

Among the genera of the family *Hemiuridae*, the present fluke more closely resembles *Lecithochirium* and *Sterrhurus*. It can easily be differentiated from the latter by the presence of a presomatic pit, and from the

former genus by the absence of lateral inward thickenings of the oral sucker. Besides these two points, the most important distinctive feature is the presence of the « pre-oral sucker » and a pair of powerful spherical « shoulder muscles » which are situated at sides of the body between the suckers. In the subfamilies *Sterrhurinae* Looss, 1907 and *Dinurinae* Looss, 1907 the pre-oral lips have varying degrees of development of the pre-oral lip muscles, but in the present form, it appears to have developed into a « sucker » or « sucker-like structure », which is most distinctive. In some serial sections of *Lecithochirium rufoviride* (Rud., 1819) Lühe, 1901, the type of the genus, no « shoulder muscles » or « pre-oral sucker » was evident. Accordingly a new subfamily is proposed for the reception of *Grassitrema* gen. nov.

TRITHELAMINAE subf. nov.

Hemiuridae, with characters of family. Mouth overhung by lip with small sucker.

Genera: *Grassitrema* gen. nov.

Family PTYCHOGONIMIDAE Dollfus, 1936.

Ptychogonimus megastoma (Rudolphi, 1819) Lühe, 1900.

The material examined came from two tubes of fixed specimens collected from the stomach of the dogfish, *Mustelus antarcticus* from Otago Harbour, New Zealand. One lot of specimens were collected in 1930 and the other in 1933. This parasite was for many years known only from Europe, but recently it has been reported from Bermuda by HANSON (1950) and now from New Zealand.

ACKNOWLEDGMENTS.

The writer is deeply indebted to Mr. S. PRUDHOE of the British Museum (Nat. Hist.) for his great kindness in allowing the writer to examine the specimens and for his invaluable help and advice in this work. To Professor J. J. C. BUCKLEY under whose guidance this work was done, he wishes to express his deepest gratitude, and to Doctor P. L. LE ROUX he is most grateful for his helpful criticisms.

SUMMARY

1. - In this paper three species of trematodes from New Zealand fishes are reported.

2. - In a detailed study, *Tubulovesicula muraenesocis* Yamaguti, 1934, is considered a synonym of *Tubulovesicula angusticauda* (Nicoll, 1915) now recorded from eels.

3. - A new hemiurid, *Grassitrema prudhoei* gen. et sp. nov., is described from New Zealand eels, and it is placed in a new subfamily *Trithelaminae*.

4. - *Ptychogonimus megastoma* is recorded from the dogfish *Mustelus antarcticus*.

RIASSUNTO

1. - In questo lavoro vengono segnalate tre specie di trematodi parassiti di pesci della Nuova Zelanda.

2. - In seguito ad uno studio dettagliato, *Tubulovesicula muraenesocis* Yamaguti, 1934, viene considerata sinonimo di *Tubulovesicula angusticauda* (Nicoll, 1915), qui segnalata come parassita di anguille.

3. - Un nuovo emiuride, *Grassitrema prudhoei* gen. et sp. nov., è descritto come parassita di anguille nella Nuova Zelanda e viene posto nella nuova sottofamiglia *Trithelaminae*.

4. - *Ptychogonimus megastoma* viene segnalato come parassita di *Mustelus antarcticus*.

BIBLIOGRAPHY

DAWES, BEN. (1947): « The Trematoda of British Fishes ». 364 pp. *Ray Society, London.*

FUHRMAN, O. (1928): « Trematoda ». In Kükenthal und Krumbach, *Handbuch d. Zool.* *V.* 2 pp. 1-140.

HANSON, M. L. (1950): « Some Digenetic Trematodes of Marine Fishes of Bermuda ». *Proc. Helm. Soc. Washington, 17,* (2), 74-89.

JONES, DILYS O. (1953): « The Anatomy of Three Digenetic Trematodes, *Skrjabinella aculeatus* (Odhner), *Lecithochirium rufoviride* (Rud.) and *Sterrhurus fusiformis* (Lühe) from *Conger conger* (Linn.). » *Parasitology, 35* (*1/2*), 40-57.

LOOSS, A. (1907): « Beiträge Zur Systematik der Distomen. Zur Kenntnis der Familie Hemiuridae ». *Zool. Jb. 26* (*1*), 63-180.

LYSTER, L. L. (1940): « Parasites of Some Canadian Sea Mammals ». *Canad. Jour. Res. Sec. D., 18* (*12*), 395-409.

MANTER, H. W. (1947): « The Digenetic Trematodes of Marine Fishes of Tortugas, Florida ». *Amer. Midl. Nat. 38* (*2*), 257-416.

NICOLL, W. (1915): « The Trematode Parasites of North Queensland. III. Parasites of Fishes ». *Parasitology, 8* (*1*), 22-41.

YAMAGUTI, S. (1934): « Studies on the Helminth Fauna of Japan, Part 2. Trematodes of Fishes, I. ». *Jap. J. Zool., 5* (*3*), 468-475.

YAMAGUTI, S. (1940): « Idem. Pt. 31. Trematodes of Fishes VII ». *Ibid., 9* (*1*), 35-108.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 4 - Ottobre 1954

TOXOPLASMOSEFORSCHUNG IM LICHTE DER MALARIAFORSCHUNG

ALBERT WESTPHAL (*)

Giovanni Battista Grassi, geboren im Jahre 1854, hatte das grosse Glück, zu einer Generation zu gehören, die auf dem Gebiet der Parasitologie, insbesondere der tropischen und subtropischen Erkrankungen, grundlegende Erkenntnisse erarbeitet hat. Zu den verschiedenartigen Gebieten, auf denen Grassi hervorgetreten ist,gehört nicht zuletzt auch die Malariaforschung. Erwähnt seien hier nur Grassis klassische Studien eines Zoologen über die Malaria aus dem Jahre 1900. Die Benennung der drei Arten, *Plasmodium vivax Pl. malariae* und *Pl. immaculatum* wurde von ihm zusammen mit Feletti eingeführt, und durch die Erkenntnis der Begrenzung der Malariaübertragung auf die Mückengattung Anopheles wurde die Parasitologie der Malariaerreger des Menschen offensichtlich abgerundet erkannt. Die Darstellung Grassis über den Entwicklungszyklus der Malaria parasiten war lange Zeit die Grundlage unseres Wissens über diese Protozoen, bis sich herausstellte. dass die Blutinfektion bei der Malaria zwar klinisch von entscheidender Bedeutung ist, dass aber die Grundlage der Malariainfektion eine Gewebsinfektion sei wie allgemein bei den Coccidien, von denen sie sich, wie Reichenow wiederholt dargestellt hat, phylogenetisch ableiten. Auf das umfangreiche Schrifttum über die exoerythrocytären Stadien der verschiedenen Plasmodien, die zunächst bei der Vogelmalaria und erst später bei Affen- und Menscheninfektionen nachgewiesen wurden, soll hier im einzelnen nicht eingegangen werden. Interessieren soll hier nur die Tatsache, dass rund 20 Jahre vergingen, in denen man bereits aus zahlreichen Gründen und Beobachtungen sowie bald auch in Analogie zum Verhalten der Vogelplasmodien fest davon überzeugt war, dass auch beim Menschen exoerythrocytäre Formen als Grundinfektion der Malaria vorhanden sein müssen, bis es schliesslich im Jahre 1948 Shortt und Garnham gelang, bei einer *Pl. vivax*-Infektion die Gewebsstadien der Parasiten in Parenchymzellen der menschlichen Leber nachzuweisen, woraufhin bald auch der Nachweis für *Pl. falciparum* (*immaculatum*) gelang. Wie bekannt, gelang dieser Erfolg nur unter anormalen Infektionsbedingungen. 3600 Anopheles konnten sich bei dem Versuch mit *Pl. vivax* an einem Malariankranken infizieren, hiervon saugten 2010 Mücken an der zu infizierenden Versuchsperson. Nach Kontrollen

(*) Aus dem *Bernhard-Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankreiten, Hamburg.* (Direktor: Prof. Dr. E. G. Naŭck). *Protozoologische Abteilung* (Abt.-Vorstehr: Dr. A. Westphal).

enthielten 86% der Mücken Sporozoiten, so dass rund 1760 Anopheles Sporozoiten mit dem Speichel beim Stich übertrugen. Da in der infizierten Speicheldrüse einer einzigen infizierten Mücke bis zu 200.000 Sporozoiten gezählt werden, geht aus diesen Zahlen die ungeheure Sporozoitenmenge hervor, deren Uebertragung auf einen Menschen dazu führte, den mikroskopischen Nachweis der exoerythrocytären Plasmodienstadien im Leberpunktat zu ermöglichen. Da die nachgewiesenen Parasitenanhäufungen im Leberparenchym bis zu 42 μ gross waren, ist ohne weiteres einzusehen, dass nicht etwa die Schwierigkeit des mikroskopischen Erkennens in der Grössenordnung der Plasmodienstadien zu suchen ist, sondern dass lediglich die Spärlichkeit der Infektion im Gewebe die Ursache dafür ist, dass unter normalen, natürlichen Infektionsbedingungen vor und nach den Versuchen von Shortt und seinen Mitarbeitern niemals exoerythrocytäre Stadien der Plasmodien beim Menschen gefunden wurden, obwohl seit der Entdeckung der Malariaparasiten durch Laveran im Jahre 1880 ungezählte Sektionen und histologische Untersuchungen an Malaria Verstorbenen durchgeführt wurden. Wir sehen also, dass die verhältnismässig frühzeitige Erkennung der Malariaparasiten beim Menschen lediglich dem Umstande zu verdanken ist, dass hier zeitweise eine Entwicklungsphase des Parasiten aufzutreten pflegt, nämlich die Infektionsphase der Erythrocyten, die bei genügend reichlicher Ausbildung mikroskopisch leicht nachzuweisen ist. Es kann kein Zweifel darüber bestehen, dass ohne diese zur Ausbildung der Gametocyten führende Entwicklungsphase der Plasmodien, die die Ubertragung durch ein blutsaugendes Insekt sichern soll, heute die Möglichkeit der Malariainfektion beim Menschen noch vollkommen unbekannt wäre.

Man sollte sich diese am Beispiel der menschlichen Malaria dargelegten Tatsachen klar vergegenwärtigen, wenn heute oft leichthin Kritik an der Erforschung einer anderen Protozoeninfektion des Menschen geübt wird, nämlich an der Toxoplasmoseforschung. Es mussten fast 6 Jahrzehnte seit der Entdeckung der Malariainfektion des Menschen durch Laveran 1880 vergehen, bis in den Jahren 1937/39 Wolf, Cowen und Paige die Infektionsmöglichkeit des Menschen mit *Toxoplasma gondii* nachwiesen. Wir müssen dabei bedenken, dass diese 57 Jahre in eine Zeit fallen, in der die mikroskopische Untersuchungstechnik sowohl in der Pathologie als auch in der Parasitologie in allen Laboratorien und Kliniken bereits zu einem täglichen Untersuchungsfundament geworden war. Auch diese Tatsache des späten Toxoplasmanachweises beim Menschen lässt sich nicht durch die Grössenordnung der Parasiten erklären, die mit einer Grösse bis etwa 7 μ als Einzelparasit bei geeigneter Färbung, insbesondere bei der Giemsafärbung, mikroskopisch gut erkennbar sind, vom Nachweis der wesentlich grösseren Parasitenanhäufungen als Pseudocysten ganz zu schweigen.

Wie bei den Malaria-Gewebsinfektionen beruht auch bei der Toxoplasmose, die im Gegensatz zur Malaria lediglich als Gewebsinfektion zur Entwicklung kommt, die Schwierigkeit des Parasitennachweises meist auf der Spärlichkeit

der Infektion. Nur in manchen akuten Fällen kann der Parasit so reichlich im infizierten Gewebe vorhanden sein, dass sein mikroskopischer Nachweis verhältnismässig leicht gelingt. Solche Fälle liegen, wie bei den Befunden von Wolf, Cowen und Paige, vorwiegend bei cerebralen Infektionen kleiner Kinder nach diaplazentarer Infizierung vor. In vielen Fällen, besonders bei klinisch symptomlosen oder symptomarmen Infektionen Erwachsener, ist der Toxoplasmanachweis mikroskopisch praktisch nicht zu arbringen, wenn nicht gerade ein histologischer Zufallsbefund anfällt. Solche latenten Infektionen können jedoch unter Umständen nach der diaplazentaren Parasitenübertragung durch die Erkrankung der Kinder wieder in Erscheinung treten. Diese am Menschen beobachteten Verhältnisse sind auch im Tierversuch nachweisbar und führten dazu, andere Methoden als nur den mikroskopischen Parasitennachweis zur Diagnostik der Toxoplasmose als Erkrankung oder besonders auch der latenten Toxoplasmainfektion heranzuziehen. So entwickelte vorwiegend Sabin mit seinen Mitarbeitern mehrere serologische Verfahren, von denen heute der Serofarbtest nach Sabin un Feldman sowie das Prinzip der Komplementbindungsreaktion am gebräuchlichsten sind. Diese Methoden gestatteten in grösserem Masse epidemiologische Untersuchungen und führten zu der Erkenntnis, dass die Häufigkeit der Infektion in gar keinem Verhältnis zur Seltenheit des Parasitennachweises steht. Es kann gar kein Zweifel darüber bestehen, dass alle serologischen Diagnosen bestenfalls indirekte Infektionsnachweise sind und dass hierbei der Fehler einer Unspezifität möglich werden kann. Es kann aber noch weniger ein Zweifel darüber bestehen, wie sich experimentell im Tierversuch bestätigen lässt, dass den serologischen Untersuchungsmethoden für die Toxoplasmoseforschung und für die klinischen Belange eine grosse Bedeutung zukommt. Es gibt kein besseres Beispiel als das der Malaria-Gewebsinfektion des Menschen, uns zu zeigen, dass der klassischen Methodik des direkten, mikroskopischen Parasitennachweises, so wünschenswert dieser ist und bleiben wird, bei gewissen Infektionen nur eine sehr untergeordnete Bedeutung zukommt. Es liegt eine gewisse Ironie darin, dass die Parasitologen bei der Toxoplasmoseforschung dieser Einsicht folgten und bemüht waren, die Serodiagnostik ergänzend zu entwickeln, während die Pathologen die neu gewonnenen Erkenntnisse oft ablehnten, indem sie die Belange der Parasitologen vertraten und ihrerseits wieder den direkten, mikroskopischen Parasitennachweis forderten. Bedenken wir jedoch, dass die Toxoplasmainfektion im Gegensatz zur Malariainfektion nur als reine Gewebsinfektion auftritt, dass wir also bei der Toxoplasmose nicht wie bei der Malaria eine mikroskopisch leicht nachweisbare Entwicklungsphase haben, müssen wir zugeben, dass die Serodiagnostik der Toxoplasmose der einzige Weg ist, die diagnostischen Möglichkeiten zu erweitern. Die klinischen und besonders die experimentellen Erfahrungen in den letzten Jahren haben die Richtigkeit dieses Weges eindeutig bewiesen, so dass die Meinung, dass in jedem Falle ein direkter Parasitennachweis erforderlich wäre, um die Toxoplasmosediagnose zu sichern, hinfällig wird.

Das gilt besonders für die zahlreichen latenten Infektionen. Im Hinblick auf die Einwände, dass in jedem Falle wenigstens bei histologischen Präparaten der Parasitennachweis zu fordern wäre, kann heute nur festgestellt werden, dass im Vergleich zur Gewebsinfektion bei der Malaria, an der heute niemand mehr zweifeln würde, bei der Toxoplasmose geradezu erstaunlich oft Parasiten nachgewiesen wurden, obgleich die bisherigen Erregerbefunde weitgehend zurücktreten. Haben wir somit gelernt, das Problem der Malaria heute anders zu sehen als zur Zeit Grassis, so sollten wir auch lernen, die gewonnene Einsicht im Hinblick auf andere Protozoeninfektionen, in diesem Falle im Hinblick auf die Toxoplasmose, unter gegebener Voraussetzung zu respektieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Grundinfektion bei der Malaria des Menschen ist die Gewebsinfektion. Sie wurde seit langer Zeit vermutet und durch Shortt und Garnham unter ausserordentlichen Versuchsbedingungen bestätigt. Trotzdem ist unter normalen Bedingungen im pathologischen und parasitologischen Laboratorium der Nachweis der Malaria-Gevebsinfektion beim Menschen niemals gelungen. Unser Wissen un die Infektionsmöglichkeit des Menschen mit Malaria verdanken wir nur dem Umstand, dass von Zeit zu Zeit eine zur Gametenbildung führende Erythrocyteninfektion eintreten kann Dieses klassische Beispiel beweist, dass der mikroskopische Parasitennachweis nicht immer als entscheidende diagnostische Grundlage bewertet werden darf und ermahnt zu grösserer Toleranz gegenüber der Notwendigkeit der serologischen Untersuchungsmethoden bei der Toxoplasmose der Menschen, bei der nur die Gewebsinfektion möglich ist.

RIASSUNTO

E' noto che alla base della malaria umana è una infezione tissulare; per lungo tempo sospettata, essa fu poi confermata in eccezionali condizioni sperimentali da Shortt e Garnham. Tale infezione tissulare non si è invece mai riusciti a dimostrare con le usuali ricerche di laboratorio, sia patologiche che parassitologiche: sì che la diagnosi di malaria nell'uomo è possibile solo per il fatto della comparsa, di tanto in tanto, di parassiti endoeritrocitici da cui derivano forme gametocitiche. Questo esempio classico dimostra come non sempre, nelle parassitosi, l'esame microscopico possa essere considerato come sicura base diagnostica; per cui si richiama l'attenzone sulla necessità di metodi sierologici di ricerca nella toxoplasmosi umana in cui la sola infezione tissulare è possibile.

SUMMARY

The infection of malaria in human beings is primarily a tissue infection, which had been suspected for a long time. Recently Shortt and Garnham were able to demonstrate it by particular experimental conditions. Such a tissue infection had never been shown by the routine laboratory pathological or parasitological methods. Therefore, the diagnosis of malaria, in man is only possible because of the appearance, now and then, of endoerythrocytic parasites from which the gametocytes derive. This classical example shows that microscopical examination of a tissue infection not always may be considered as a true diagnostic basis. The author, therefore, calls attention to the necessity of serologic diagnostic methods in human toxoplasmosis where only tissue infection is possible.

Direttore responsabile: Dott. E. Mosna

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22